

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Teste de Ames: Contributo para o estudo da genotoxicidade das águas

Liliana Sofia Dias Gonçalves

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Maria João Aleixo Silva
Professora Doutora Deodália Dias

2016

“But man is a part of nature,
and his war against nature
is inevitably a war against himself.”

“In nature nothing exists alone.”

Rachel Carson

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Doutora Deodália Dias e à Doutora Maria João Silva por terem aceite serem minhas orientadoras.

Ao INSA, particularmente ao Departamento de Saúde Ambiental, na pessoa da Dra. Helena Rebelo, por me ter recebido e disponibilizado os recursos à realização deste projeto. A todos os profissionais do instituto que me darem o seu tempo, conhecimento ou palavra de apoio, nomeadamente, aos do Laboratório de Meios de Cultura, Esterilização e Preparação do Material (DDI) e do Laboratório de Química e Toxicologia (UAS, DSA). Em especial à Dra. Isabel Albergaria e à Dra. Sílvia José por terem sido minhas orientadoras, colegas e principalmente amigas.

À APORVELA (Associação Portuguesa de Treino de Vela) por ter realizado a colheita das amostras de água do Estuário do Sado.

Ao Doutor João Paulo Noronha do Departamento de Química da FCT/UNL por nos ter recebido no seu laboratório e pelo esclarecimento de dúvidas.

Ao Professor Doutor José Rueff, Coordenador do Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, por nos ter recebido no seu departamento.

Ao Doutor Michel Kranendonk do Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, por me ter ajudado na implementação do teste de Ames, através do conhecimento e disponibilização de recursos. Um agradecimento a todos os profissionais deste laboratório que me ajudaram neste processo, em especial ao Doutor Francisco Esteves e à Dra. Diana Campelo por todo o tempo e paciência despendida.

Aos professores e colegas de mestrado pela oportunidade e partilha de conhecimentos nos últimos dois anos. A todos os meus professores dos restantes 16 anos, principalmente aos que me acompanharam na Licenciatura em Saúde Ambiental, por me terem preparado tão bem para esta etapa.

Aos meus colegas e amigos da licenciatura, porque “crescemos” juntos e mesmo longe são um grande apoio para alcançar os meus objetivos.

Ao escutismo, ao Agrupamento 512 Peniche e aos meus irmãos escutas, por tudo o que me ensinaram e ensinam, por serem um escape perante as dificuldades, pelas palavras de incentivo e por perceberem as minhas ausências durante o último ano.

A todos os meus amigos pelas palavras de apoio, por acreditarem em mim, pela preocupação ou simplesmente pelos momentos em que me faziam sair de casa... sem vocês teria sido muito mais difícil.

À minha família, especialmente à minha mãe e às minhas irmãs Cátia, Beatriz e Ana, por terem sido o meu alicerce, por se preocuparem, por acreditaram em mim nos momentos em que nem eu acreditava, por tudo: obrigada.

Aos que já partiram porque, onde quer que estejam, o amor deles continua a ser o meu grande apoio.

E a Ele, porque me deu a fé.

Resumo

Sendo a poluição dos recursos hídricos um problema a nível global, é de extrema importância o estudo e controlo dos seus poluentes. No caso do Estuário do rio Sado, situado na zona litoral Oeste de Portugal, estudos prévios indicaram a existência de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pesticidas e metais pesados nos sedimentos, com distribuição heterogénea. Relativamente à genotoxicidade dos sedimentos, verificou-se que a mistura de poluentes extraídos das amostras da área Sul tinha a capacidade de induzir lesões na molécula do ADN enquanto os poluentes das amostras da área Norte causavam, principalmente, alterações permanentes nos cromossomas.

Um dos ensaios mais utilizados para a caracterização do potencial mutagénico de amostras ambientais, incluindo águas superficiais, é o teste de Ames que permite identificar substâncias com potencial para induzir mutações génicas do tipo *frameshift* ou por substituição dos pares de base. Este teste consiste na utilização de estirpes de *Salmonella typhimurium* com mutações em vários genes do operão da histidina, sendo incapazes de crescer e formar colónias na ausência deste aminoácido. Quando expostas a uma substância (ou mistura) que possa induzir a formação de mutações, a função do operão é restaurada, tornando-se assim as bactérias independentes da presença de histidina no meio de cultura. Um aumento do número de colónias formadas relativamente ao controlo negativo será pois indicativo de uma atividade mutagénica.

O presente estudo teve como objetivo a implementação do teste de Ames para a caracterização do potencial mutagénico das águas do Estuário do Sado. Para esse fim desenvolveu-se, numa primeira fase, um método de concentração baseado numa extração em fase sólida (SPE) dos compostos orgânicos e implementou-se o teste de Ames no laboratório, com recurso a compostos reconhecidamente mutagénicos (controlos positivos). Foram colhidas 6 amostras de água distribuídas pelas zonas norte e sul do referido Estuário. Essas amostras (5000 mL), juntamente com uma amostra de água fortificada, foram filtradas e submetidas ao método de concentração, sendo os compostos depois eluídos com diclorometano:metanol (50:50). De seguida, as propriedades mutagénicas dos extratos rediluídos em DMSO foram analisadas através do teste de Ames usando as estirpes TA98 e TA100, com e sem adição do sistema exógeno de metabolização S9 mix. A gama de concentrações utilizada foi de 10, 20 e 40 µL de extrato por placa nas amostras de água reais e 1, 5, 10, 20 e 40 µL de extrato por placa na amostra fortificada.

Os resultados mostraram que, nas condições utilizadas, quer os extratos obtidos a partir das seis amostras de água do Estuário do Sado, quer o da amostra fortificada, não foram capazes de induzir um aumento significativo na frequência de mutantes, pelo que nenhuma das amostras revelou um potencial mutagénico, com recurso ao teste de Ames. Apesar das diversas variáveis a considerar na realização deste estudo que poderão ter influenciado os resultados, considera-se que a implementação do teste de Ames permitiu a realização de uma primeira abordagem à problemática da poluição estuarina e seu impacto na saúde humana, sendo ponto de partida para estudos futuros mais completos.

Palavras-chave: mutagenicidade; teste de Ames; estuário; água

Abstract

Given that the pollution of hydric resources is a global problem, the study and control of the pollutants is of utmost importance. In the case of the Sado River estuary, located in the west coastal area of Portugal, previous studies have indicated the existence of polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides and heavy metals in sediment, with a heterogeneous distribution. Regarding the genotoxicity of sediments, it was found that the mixture of pollutants extracted from the samples collected in the South area had the ability to induce lesions in the DNA molecule, while the pollutants from the samples collected in the North area caused, mainly, permanent chromosome alterations.

One of the most used assays for the characterization of the mutagenic potential of environmental samples, including surface waters, is the Ames Test, that allows the identification of substances with potential to induce gene mutations, including *frameshift* and base substitutions. This test consists of using *Salmonella typhimurium* strains with mutations in various genes within the histidine operon, being unable to grow and form colonies in the absence of this amino acid. When exposed to a substance (or mixture) that can induce the formation of mutations, the operon function is restored, thus making bacteria independent of the presence of histidine in the culture medium. An increase in the number of colonies formed relative to the negative control is therefore indicative of a mutagenic activity.

This study aimed to implement the Ames Test for the characterization of the mutagenic potential of the Sado Estuary waters. For this purpose on a first phase, a method of water concentration based on solid phase extraction (SPE) of organic compounds was developed, and the Ames Test was implemented in laboratory, using compounds proven to be mutagenic (positive controls). As to the water samples, six samples were collected, distributed by the north and south areas of Sado Estuary. These samples (5000 mL), together with a fortified water sample, were filtered and subjected to the concentration method, being the compounds then eluted with dichloromethane:methanol (50:50). Then, the mutagenic properties of the extracts rediluted in DMSO were analyzed through the Ames Test using strains TA98 and TA100, with and without the metabolizing exogenous system, S9 mix, addition. The concentration range used was 10, 20 and 40 μL of extract per plate from the real water samples, and 1, 5, 10, 20 and 40 μL of extract per plate from the fortified sample.

The results showed that, under the conditions used, both the extracts obtained from the six water samples from the Sado Estuary and the extracts obtained from the fortified sample, were not able to induce a significant increase in the mutant frequency and thus, none of the samples showed a mutagenic potential through the use of Ames Test. Despite the many variables to consider in this study that may have influenced the results, it is considered that the implementation of the Ames Test allowed for a first approach to the estuarine pollution and its impact on human health problem, and therefore can be a starting point for more complete future studies.

Keywords: Mutagenicity; Ames Test; Estuary; Water

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract	v
Índice.....	vi
Índice de Tabelas.....	viii
Índice de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	ix
1. Introdução.....	1
1.1 Ambientes Aquáticos e a sua Poluição.....	1
1.1.1 Principais Poluentes dos Estuários e os seus Efeitos na Saúde	1
1.1.2 O Estuário do rio Sado	2
1.2 Ensaio de Genotoxicidade	4
1.2.1 Teste de Ames	4
1.3 Aplicação do Teste de Ames a Amostras de Água Superficial	7
1.3.1 Fase pré-analítica - Métodos de Concentração de Águas	8
2. Objetivos	13
3. Materiais e Métodos	14
3.1 Material e Equipamento	14
3.2 Reagentes, solventes e soluções	14
3.2.1 Validação do método SPE-GC-MS e concentração das amostras de água	14
3.2.2 Aplicação do Teste de Ames	15
3.3 Colheita das Amostras de Água	15
3.4 Validação da Metodologia SPE.....	15
3.4.1 Estudo dos Parâmetros de Validação da Metodologia SPE-GC-MS	16
3.4.2 Fortificação de Amostras de Água	17
3.4.3 Método de Extração em Fase Sólida (SPE).....	17
3.4.4 Determinação da Taxa de Recuperação.....	19
3.5 Concentração das Amostras de Água para Aplicação do Teste de Ames	19
3.6 Teste de Ames	20
3.6.1 Reisolamento das Estirpes a partir do <i>Stock Master</i>	20
3.6.2 Confirmação das Características Genéticas das Estirpes	20
3.6.3 Curva Dose-Resposta	21

3.6.4 Aplicação do Teste de Ames para identificação do potencial mutagénico de amostras de água, após concentração	21
4. Resultados	24
4.1 Validação do Método Analítico: SPE-GC-MS.....	24
4.1.1 Estudo da Seletividade	24
4.1.2 Estudo da Linearidade	25
4.1.3. Estudo dos Limiares Analíticos.....	26
4.1.4 Estudo da Exatidão	26
4.2 Determinação da Taxa de Recuperação pelo Método SPE-GC-MS	27
4.3 Caracterização Físico-química das Amostras do Estuário do Sado	28
4.4 Implementação e Validação do Teste de Ames.....	29
4.4.1 Confirmação das Características Genéticas das Estirpes	29
4.4.2. Curvas dose/resposta para agentes reconhecidamente mutagénicos	30
4.4.3. Aplicação do teste de Ames para deteção do potencial mutagénico de amostras de água do Estuário do Sado.....	31
5. Discussão.....	33
6. Conclusão e Considerações Finais	38
7. Referências Bibliográficas	39
8. Anexos.....	44
Anexo A – Listagem de material e equipamento utilizado no decorrer do projeto.....	44
Anexo B – Resultados da recuperação (%) dos ensaios realizados na validação da metodologia SPE	46
Anexo C – Resultados do estudo da linearidade do ensaio para obtenção das curvas dose-resposta no Teste de Ames com controlo positivo	47

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Genótipo das estirpes de <i>Salmonella typhimurium</i> mais utilizadas e respetivas mutações e plasmídeos (23).	5
Tabela 1.2 – Exemplos de métodos de concentração utilizados em estudos de genotoxicidade em águas superficiais	9
Tabela 3.1 – Concentrações da solução mistura utilizadas na elaboração das curvas de calibração.....	16
Tabela 3.2 - Ensaio de validação da metodologia SPE com descrição das variáveis em estudo	18
Tabela 3.3 - Concentrações utilizadas para obtenção da curva dose-resposta das estirpes TA98 e TA100, com os respetivos controlos positivos, com e sem ativação metabólica	21
Tabela 4.1 - Comparação entre a média do t_r de cada composto na injeção da solução individual e a média da solução mistura, em minutos	25
Tabela 4.2 - Resultados obtidos para a validação do LQ para os compostos utilizados na solução mistura: média, desvio padrão, CV e Er dos 10 padrões analisados	26
Tabela 4.3 - Valores da recuperação média da injeção direta no sistema GC-MS dos pontos 1, 3 e 6 da curva de calibração em triplicado, para o estudo da exatidão	27
Tabela 4.4 - Recuperação média (%) do ensaio n.º 20 para validação do método SPE-GC-MS em matrizes aquosas fortificadas.....	28
Tabela 4.5 - Resultados da análise química feita às amostras de água colhida no Estuário do Sado, com determinação dos parâmetros condutividade, pH, COT e cloretos	29
Tabela 4.6 - Resultados obtidos no teste de mutagenicidade realizado com o candidato da TA98 e com os cinco candidatos da TA100.....	29
Tabela 4.7 - Resultados do Teste de Ames - mutagenicidade das amostras de água após a sua concentração (amostras do estuário: A1 a A6; água fortificada: F1)	31

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Mapa do Estuário do Sado, com indicação dos diferentes locais de amostragem (N1, N2, S1, S2 e R) utilizados no estudo de Pinto <i>et al.</i> (2014)	3
Figura 1.2 - Esquema dos quatro passos do método SPE (adaptado) (55).....	11
Figura 1.3 - Os tipos de SPE consoante as interações existentes entre os analitos e o material adsorvente (adaptado) (55).....	12
Figura 1.4 - Interações existentes entre o analito e o material adsorvente de sílica modificada C18 em SPE de fase reversa por ação de forças de Van-der-Waals (adaptado) (44)	12
Figura 3.1 - Imagem satélite do Estuário do Sado. As setas indicam os locais de colheita das amostras de água (A1 – azul; A2 – verde; A3 – laranja; A4 – roxo; A5 – vermelho e A6 – preto).....	15
Figura 3.2 - Etapas do processo de validação da Metodologia SPE.....	16
Figura 3.3 – Método SPE utilizado na concentração das amostras de água.....	19
Figura 3.4 - Diagrama dos passos realizados nos ensaios do Teste de Ames (adaptado) (23).....	23
Figura 4.1 – Cromatograma obtido por injeção líquida da solução contendo os 4 compostos ($250 \mu\text{g.L}^{-1}$) no sistema de GC-MS	24
Figura 4.2 - Representação gráfica das curvas de calibração dos quatro compostos utilizados na fortificação das matrizes aquosas, soluções em EtOAc com concentrações de $25 - 250 \mu\text{g L}^{-1}$	25
Figura 4.3 - Resultados da recuperação (%) dos ensaios realizados na validação da metodologia SPE.....	27

Figura 4.4 - Resultados da recuperação (%) dos ensaios realizados para validação da metodologia SPE no estudo dos volumes	28
Figura 4.5 - Representação gráfica dos resultados do Teste de Ames para obtenção das curvas dose resposta das estirpes TA98 e TA100, sem e com ativação metabólica e respetivas retas de regressão linear.....	30
Figura 4.6 – Aspeto macroscópico das placas do controlo negativo, sem adição de mutagénico (A), e controlo positivo, com adição de 2NF (B), no ensaio sem ativação metabólica da TA98	32

Lista de Abreviaturas e Símbolos

2NF - 2-nitrofluoreno
A25 - ampicilina a 25%
ACN - acetonitrilo
ADN - ácido desoxirribonucleico
APORVELA - Associação Portuguesa de Treino de Vela
c - concentração
C8 - octil
C18 - octadecil
COT – compostos orgânicos totais
CV - coeficiente de variação
DCM - diclorometano
DMBA - dimetilbenzo(a)antraceno
DMSO – dimetilsulfóxido
DP – desvio padrão
EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
Er - erro relativo
EUA – Estados Unidos da América
EtOAc - acetato de etilo
GC - cromatografia gasosa
GC-MS - cromatografia gasosa com detetor de massa acoplado
HAP - hidrocarboneto aromático policíclico
HCl - ácido clorídrico
HepG2 - linha celular de cancro hepatocelular humano
his ⁻ - placa VB suplementada com D-biotina
IARC – Agência Internacional de Investigação sobre Cancro (do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
LD - limite de deteção
LLE – extração líquido-líquido (do inglês <i>Liquid-liquid Extraction</i>)
LPS – lipopolissacárido
LQ - limite de quantificação
MeOH - metanol
NB - <i>Nutrient Broth</i>
NB ⁻ - <i>Nutrient Broth</i> sem ampicilina

NADP - fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido
NaN₃ - azida de sódio
PBS - tampão fosfato-salino
PCB - bifenilo policlorado
PE - polietileno
PEAD - polietileno de alta densidade
PTFE - politetrafluoretileno
r - coeficiente de correlação
rfa – mutação que causa perda parcial da camada lipopolissacárida
rpm – rotações por minuto
SPE – extração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)
SPME – micro-extração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*)
t_r - tempo de retenção
v – volume
VB - meio *Vogel Bonner*
 \bar{x} - média
XAD – resina polimérica adsorvente

1. Introdução

1.1 Ambientes Aquáticos e a sua Poluição

A importância do estudo e controlo da poluição dos recursos hídricos é evidente se tomarmos em consideração dois factos: por um lado, a maior parte da superfície da terra é coberta por água e, por outro, cerca de 75% do corpo humano é composto por este elemento, o que ilustra o vínculo existente entre água, saúde e os ecossistemas (1). O aumento da poluição mundial dos recursos hídricos, principalmente os de água doce, é um dos problemas ambientais com que a humanidade se depara. Apesar da maioria dos compostos químicos estarem presentes em baixas concentrações, podem ter consequências nefastas para a saúde humana e ecossistemas, principalmente devido à formação de misturas complexas (2).

A exposição humana a estes compostos presentes na água pode ocorrer por ingestão de água e alimentos, por inalação de aerossóis e por contacto com a pele e as mucosas. A poluição das águas costeiras pode apresentar riscos para a saúde, principalmente pela ingestão de peixe ou marisco contaminado (3). Neste sentido, importa identificar como principais fontes de poluição do meio aquático, os efluentes industriais e a utilização de fertilizantes e pesticidas agrícolas, bem como a descarga de águas residuais domésticas (3-5). No caso das águas superficiais, para além das fontes de poluição direta, deve ter-se também em conta as fontes de poluição indireta causada pela deposição das emissões gasosas (4). Segundo Schwarzenbach *et al.* (2006), podem destacar-se três desafios científicos na resolução deste problema ambiental: i. o desenvolvimento de ferramentas para avaliar o impacto dos poluentes nos ecossistemas aquáticos e na saúde humana; ii. A implementação e exploração de tecnologias de remediação e de tratamento das águas, tendo em conta a relação custo-benefício; iii. a utilização de estratégias e produtos menos prejudiciais para o ambiente com o intuito de minimizar a introdução de poluentes no meio aquático (2).

É, igualmente, de extrema importância a utilização de métodos adequados de avaliação dos contaminantes aquáticos e do seu impacto na saúde humana e no ambiente. Nos programas de monitorização da qualidade da água, para além da comum análise química, os ensaios de genotoxicidade devem ser também utilizados com o objetivo de analisar a presença de agentes genotóxicos na água. O teste de Ames, em particular, pode ajudar na identificação de agentes mutagénicos com vários mecanismos de ação, presentes em águas de superfície (4).

1.1.1 Principais Poluentes dos Estuários e os seus Efeitos na Saúde

Com o desenvolvimento industrial, muitas populações e diversas indústrias estabeleceram-se perto dos estuários dos rios, não só porque estes eram potenciais fontes de água potável para as populações, como também porque se considerava aceitável a emissão de efluentes industriais e urbanos para essas águas, pressupondo que seriam depois veiculados para o mar. Esta dinâmica provocou uma acumulação de poluentes na maioria dos estuários (6).

Os estudos existentes que visaram avaliar a toxicidade da água dos estuários recorreram, principalmente, à análise dos sedimentos, uma vez que os poluentes tendem a acumular-se nos mesmos (4-5; 7). No Estuário do Sado, os grupos de contaminantes mais estudados, devido à sua

perigosidade e concentração, foram os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), os pesticidas e os metais pesados (8), o que vai ao encontro de outros estudos realizados em estuários europeus (9-10) e também noutros continentes (11). Para além destes grupos, os bifenilos policlorados (PCBs) também têm sido alvo de análise (12-13).

As consequências, para a saúde humana, decorrentes da exposição a compostos tóxicos existentes na água dependem de vários fatores, tais como, a natureza do composto químico, a via de exposição e absorção e o nível e natureza da exposição (aguda ou crónica). Apesar de existirem vários relatos de exposição aguda, causando irritação ou inflamação dos olhos e nariz, pele e sistema gastrointestinal, os efeitos mais importantes são observados na exposição crónica que pode levar ao aparecimento de doenças graves como a toxicidade hepática. Um exemplo, é a exposição prolongada a baixas concentrações de metais que pode afetar o fígado e o rim (3). Os pesticidas e outros compostos químicos persistentes podem perturbar o funcionamento do sistema endócrino com consequências na reprodução, no desenvolvimento e no comportamento humano. São, por isso, designados de desreguladores endócrinos, incluindo-se neste grupo os HAPs e os PCBs, entre outros compostos e elementos (3).

Outra das preocupações com estes compostos é a sua genotoxicidade e o facto de poderem ser cancerígenos para o homem. Sabe-se que os estudos identificam a maioria dos HAPs como sendo mutagénicos, principalmente na presença de ativadores metabólicos, o que indica que os seus metabolitos são mais tóxicos do que os compostos em si (12; 14). Existem também HAPs com resultados positivos noutros ensaios de genotoxicidade, para além dos ensaios de mutagénese, tais como no ensaio do micronúcleo (15). Os estudos de genotoxicidade envolvendo misturas complexas presentes em sedimentos estuarinos têm também revelado a sua capacidade de induzirem efeitos genotóxicos em células eucarióticas (HepG2) (9) e procarióticas (*Escherichia coli*) (12). Para além disso, tem-se ainda verificado a ocorrência de efeitos interativos (por exemplo, sinergismo), em termos de genotoxicidade, entre contaminantes orgânicos (HAPs e pesticidas) e elementos metálicos existentes, por exemplo, nos sedimentos estuarinos (13).

1.1.2 O Estuário do rio Sado

O Estuário do rio Sado é o segundo maior de Portugal e está localizado na zona litoral Oeste do país (Figura 1.1). Ao longo dos anos, tem tido um grande impacto económico tanto a nível local como nacional. A margem Norte é caracterizada pela presença de várias indústrias e pela influência da cidade de Setúbal. Na margem Sul, onde se situa a foz do Rio Sado, podem-se encontrar pequenas aldeias cuja população se dedica a atividades económicas relacionadas com a agricultura e a pesca. Para além disso, existe ainda a península de Troia com grande importância turística. Assim, o estuário tem sido afetado por poluição de origem urbana, industrial e agrícola (16-18).



Figura 1.1 - Mapa do Estuário do Sado, com indicação dos diferentes locais de amostragem (N1, N2, S1, S2 e R) utilizados no estudo de Pinto *et al.* (2014) (18).

Alguns estudos anteriores verificaram a existência de vários compostos químicos nos sedimentos do estuário, tais como diversos metais (por exemplo, cromo, chumbo, cobre, níquel, zinco), pesticidas e HAPs (8). Desta forma, é uma preocupação premente o facto deste tipo de poluição poder ser bioacumulada nas espécies estuarinas ou nos produtos agrícolas, com a hipótese de entrada na cadeia alimentar humana (18). A distribuição de poluentes nos sedimentos em vários pontos do estuário é bastante heterogénea, constatando-se uma distinção entre as zonas Norte (de influência urbana e industrial) e Sul (de influência rural e fluvial). Esta diferença torna-se mais óbvia nas concentrações de compostos orgânicos, principalmente HAPs, sendo que se determinaram concentrações superiores na zona Norte (17). Um elemento particularmente estudado, devido à sua bioacumulação na biota, foi o mercúrio que foi quantificado nos sedimentos da zona Norte e na coluna de água em concentrações acima dos limites legais. No entanto, o mesmo não se verificou na análise às matrizes biológicas (algas e fauna estuarina) (19) pressupondo-se, assim, que a exposição humana a mercúrio também será reduzida.

Relativamente à toxicidade dos contaminantes sedimentares, os resultados dos ensaios de genotoxicidade realizados em estudos anteriores revelaram que a mistura dos contaminantes extraídos de amostras de sedimentos da área Norte causava uma indução de alterações permanentes nos cromossomas, analisada através do ensaio do micronúcleo, numa linha celular humana. Por outro lado, as amostras de sedimentos colhidas na zona Sul induziram preferencialmente danos oxidativos no ácido desoxirribonucleico (ADN) da mesma linha celular (17-18). Um outro estudo realizado com as mesmas misturas de contaminantes sugeriu que os contaminantes presentes nas amostras da área Norte do Estuário podem também afetar os mecanismos de reparação de lesões do ADN em células da linha celular de cancro hepatocelular humano (HepG2) e, desta forma, facilitar a acumulação de mutações (20). Também os peixes e os bivalves parecem ser afetados pela exposição aos compostos presentes nos sedimentos do estuário (21-22). Um estudo com *Solea senegalensis*, revelou danos genotóxicos, quando os peixes foram expostos à contaminação dos sedimentos durante 28 dias em laboratório e em campo (21).

Existindo várias populações residentes ao longo das margens do estuário e que utilizam os seus serviços para a sua subsistência (pesca e agricultura) ou para atividades recreativas, sabe-se que a exposição direta aos contaminantes estuarinos ocorre através do contacto direto com os sedimentos e com a água. Porém, e não menos importante, é a exposição indireta aos contaminantes através do consumo de produtos locais. Alguns desses produtos (por exemplo, peixe e bivalves) podem ter contaminantes bioacumulados nas suas partes edíveis que entrarão assim na cadeia alimentar humana (20). Assim, e devido à escassez de estudos nesse sentido, importa também avaliar a toxicidade da água do Estuário do Sado, principalmente ao nível do potencial genotóxico e comparar com os estudos anteriormente realizados nos sedimentos estuarinos.

1.2 Ensaio de Genotoxicidade

A exposição do organismo a agentes tóxicos é uma problemática a ser avaliada nos dias de hoje, dado que a exposição a alguns desses agentes, pode ser associada a doença humana. Em particular, a interação entre fatores ambientais e o genoma das células somáticas pode induzir alterações permanentes que poderão estar associadas ao desenvolvimento de doença genética, designadamente, de processos cancerígenos. Por outro lado, as mutações induzidas pela exposição a substâncias químicas podem potencialmente ocorrer na linha germinativa, causando problemas reprodutivos e o aparecimento de doença genética em gerações futuras (23-24).

A genotoxicidade relaciona-se com a capacidade dos xenobióticos provocarem danos no ADN e/ou em componentes celulares que regulam ou afetam a integridade do genoma. Assim, a genotoxicidade é um termo mais abrangente do que a mutagenese, que se refere à capacidade de determinado tóxico aumentar a frequência de mutações na molécula de ADN (mutações génicas) ou nos cromossomas (alterações cromossómicas) (25).

Dada a dificuldade em estudar os efeitos carcinogénicos de determinada substância ou composto, utilizam-se os denominados ensaios de genotoxicidade com o intuito de avaliar os efeitos relativamente a três tipos de danos genéticos associados à doença humana: a mutação (ou seja, alterações na sequência de nucleótidos, que podem ser pontuais ou deleções/ inserções que afetam um único gene ou blocos de genes), a clastogénese (ou seja, aberrações cromossómicas estruturais) e a aneugénese (ou seja, alterações cromossómicas numéricas) (25). Sabe-se que nenhum teste consegue detetar todas as substâncias genotóxicas, pelo que se utilizam, de uma forma geral, baterias de testes que fornecem informações complementares. Assim, quando se caracteriza a potencial atividade genotóxica de um dado xenobiótico, são, em primeiro lugar, realizados testes *in vitro* que incluem testes de mutação génica em bactérias, como por exemplo o teste de Ames, e ensaios de mutagenese/genotoxicidade em células de mamíferos *in vitro*. Os ensaios *in vivo* são recomendados apenas nos casos em que os ensaios *in vitro* sejam positivos ou inconclusivos (25). No entanto, devido à preocupação atual de reduzir a experimentação animal, uma substância pode ser proibida devido apenas a resultados inequivocamente positivos *in vitro* (26).

1.2.1 Teste de Ames

1.2.1.1 Princípio do Método

O ensaio de reversão de mutação em *Salmonella typhimurium*, também conhecido como teste de Ames, Teste de *Salmonella* ou Ensaio do Microssoma, é um ensaio de mutagênese de curto termo que visa a identificação de substâncias com potencial para induzir mutações gênicas de tipo *frameshift* ou por substituição de pares de bases (23; 27).

As estirpes de *Salmonella typhimurium* utilizadas diferem nas mutações localizadas em vários genes do operão da histidina, tendo cada uma delas maior sensibilidade para detectar um determinado tipo de mutações e, assim, identificar o potencial mutagênico dos agentes em estudo de acordo com o seu mecanismo de ação. Estas estirpes contêm ainda outras modificações genéticas que aumentam a sua sensibilidade para uma vasta variedade de substâncias, como por exemplo, a mutação *rfa* que determina um defeito no lipopolissacárido tornando as bactérias mais permeáveis à entrada do composto químico (Tabela 1.1) (23; 27). Para além disso, algumas estirpes contêm o plasmídeo pKM101 ou fator-r que otimiza o sistema de reparação “*error prone*” e lhes confere resistência à ampicilina (Tabela 1.1) (23). Os genótipos das estirpes de *Salmonella typhimurium* deverão ser confirmados imediatamente depois da receção das culturas bacterianas, sempre que se congela um novo conjunto de *stocks* ou se preparam culturas liofilizadas, quando o número de revertentes espontâneos por placas é mais baixo do que o normal e sempre que se note uma perda de sensibilidade do ensaio face a agentes mutagénicos utilizados como controlo positivo. Para tal, são feitos os seguintes testes: dependência de histidina, mutação *rfa*, deleção *uvrB*, o fator-r, plasmídeo *pAQ1* e a taxa de reversão espontânea (27).

Tabela 1.1 - Genótipo das estirpes de *Salmonella typhimurium* mais utilizadas e respetivas mutações e plasmídeos (23).

Mutação (estirpe)	Bio chID uvrB gal	Defeito no LPS	Plasmídeo
hisG46			
TA1535	Deleção	Rfa	Sem plasmídeo
TA100	Deleção	Rfa	pKM101
hisD3052			
TA1538	Deleção	Rfa	Sem plasmídeo
TA98	Deleção	Rfa	pKM101
hisC3076			
TA1537	Deleção	Rfa	Sem plasmídeo

*LPS - lipopolissacárido

O ensaio consiste na utilização de várias estirpes de *Salmonella typhimurium* com mutações pré-existent que deixam as bactérias impossibilitadas de sintetizar um aminoácido essencial, a histidina. Assim, as bactérias são incapazes de crescer e formar colónias num meio sem histidina (23). Quando expostas a uma substância que possa induzir mutações no operão responsável pela síntese da histidina, ou na sua proximidade, a função do gene pode ser restaurada, permitindo que as células passem a sintetizar esse aminoácido. Desta forma, as bactérias conseguem crescer e formar colónias na ausência da histidina. O número de colónias formadas após a exposição das várias estirpes bacterianas a uma gama de concentrações do composto em estudo estará diretamente relacionado com o seu potencial mutagénico (23).

Uma vez que algumas substâncias químicas cancerígenas são biologicamente inativas, a menos que sejam metabolizadas no organismo por via do citocromo P450, é utilizado um sistema exógeno de ativação metabólica de mamífero (28). Normalmente é utilizado o sistema exógeno designado por S9, preparado a partir de fígado de rato - após indução dos enzimas hepáticos com um composto tóxico (aroclor ou fenobarbital), ao qual são adicionados cofatores como o fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADP) (23).

O teste de Ames tem diversas variações, no que concerne ao método utilizado. O mais comum é o método de incorporação em placas em que a amostra é misturada com a cultura bacteriana e com o top de agar suplementado com biotina e histidina (e com o S9 mix nos ensaios com ativação metabólica), que depois de homogeneizado é vertido para uma placa com agar mínimo (23; 27). No final do teste, o número de revertentes contabilizado por placa é relacionado com as concentrações do agente mutagénico em estudo. Relativamente aos controlos positivos, deve observar-se uma relação concentração-efeito relativamente ao número de colónias apurado em cada dose testada (27). O número de colónias contadas é expresso em colónias revertentes por placa (23).

Os resultados podem ser avaliados segundo procedimentos estatísticos ou não estatísticos atendendo aos seguintes critérios (23):

Positivo: Um dado composto é considerado um agente mutagénico se produzir um aumento reprodutível, relacionado com a dose, no número de colónias revertentes em uma ou mais estirpes. No entanto, é considerado um agente mutagénico fraco se o aumento no número de colónias revertentes for inferior ao dobro do número de revertentes espontâneos.

Negativo: Um dado composto é considerado não mutagénico se não se observar nenhum aumento relacionado com a dose no número de colónias revertentes em, pelo menos, duas experiências independentes.

Inconclusivo: Se um composto não puder ser classificado como um mutagénico ou não mutagénico.

1.2.1.2 Aplicações do Teste de Ames

O teste de Ames é um ensaio extremamente simples, utilizado para detetar o potencial mutagénico de produtos químicos, amostras ambientais, fluidos corporais, alimentos, drogas e agentes físicos. Geralmente é encarado como um teste de triagem, com capacidade para identificação dos efeitos adversos de substâncias químicas e com resultados que necessitam de confirmação através de testes mais complexos (29). A extrapolação de resultados deste teste para o ser humano depende de fatores como a farmacocinética e a farmacodinâmica das substâncias ou compostos em estudo (25).

As principais vantagens do teste de Ames são a sua simplicidade, relação custo-eficácia, a flexibilidade (pode ser utilizado em vários tipos de amostra) e a existência de um grande banco de dados validados. Para além disso, o facto de existirem procedimentos padronizados, a garantia de qualidade e de avaliação estatística são fatores a considerar (29). Outra das vantagens deste ensaio é a possibilidade de se estabelecer uma relação dose-resposta (4).

Parece também existir uma elevada correlação entre o potencial mutagénico de substâncias químicas detetado pelo teste de Ames e a carcinogenicidade das mesmas (30-31). Há quarenta anos, MacCann e Ames admitiam já a importância deste teste tendo em vista o rastreio das propriedades mutagénicas de compostos numa fase precoce do seu desenvolvimento e a identificação de produtos químicos

mutagénicos no ambiente (30). Desde então, a realização de estudos com base neste ensaio associado às amostras ambientais atingiu um pico na década de 80 e tem-se mantido constante até ao presente. O mesmo se verifica com estudos específicos relativamente à pesquisa de contaminantes mutagénicos na água (29). De facto, os bioensaios, tais como o teste de Ames, são frequentemente utilizados para avaliar a toxicidade de amostras ambientais pois não é necessária a identificação das substâncias presentes nessas amostras que poderão constituir misturas bastante complexas (32).

Apesar de ser utilizado apenas numa fase inicial da avaliação do risco de exposição ao agente químico, para identificação do perigo de indução de um efeito mutagénico, existe um esforço premente para a valorização deste método devido às suas vantagens e de forma a minimizar a experimentação *in vivo*. Assim, vários especialistas analisaram bases de dados para estimar o valor preditivo do teste de Ames relativamente aos resultados obtidos nos ensaios mais complexos de genotoxicidade e carcinogenicidade. Apesar da falta de dados não permitir uma conclusão mais assertiva, existem padrões de resultados de ensaios em células de mamífero que indicam se um teste de Ames positivo é ou não suscetível de ser genotóxico ou cancerígeno *in vivo* (26).

1.3 Aplicação do Teste de Ames a Amostras de Água Superficial

A utilização de bioensaios de curto termo, tal como o teste de Ames, permite a quantificação do potencial mutagénico de amostras ambientais (4; 24; 32-33) com a vantagem adicional de dar informação sobre as classes de mutações induzidas (*frameshift* ou substituições de bases) tendo em conta a resposta das várias estirpes de *Salmonella* (34).

Assim, o teste de Ames tem sido amplamente utilizado no estudo do potencial mutagénico de águas superficiais, tais como águas de rios, lagos e de estuários (4). No Brasil, estado de São Paulo, está incluído nos programas de monitorização da qualidade da água, onde é utilizado na avaliação genotóxica de águas superficiais utilizadas para consumo humano após o seu tratamento (35). Estudos analisados por Ohe *et al.*, (2004) mostraram que a maioria dos investigadores utiliza o método de incorporação em placa, com e sem ativação metabólica, e as estirpes TA98 e TA100 são as mais utilizadas. Os resultados apontam para 15% de amostras positivas com a TA98 *versus* 7% com a TA100, com e sem ativação metabólica. Estes dados sugerem a predominância de substâncias que induzem mutações do tipo *frameshift* (4). Por exemplo, no estudo descrito por Wu (2005), que teve como objetivo a avaliação da atividade mutagénica de amostras de água do estuário Yangtze (China) através do teste de Ames, obtiveram-se resultados positivos com a estirpe TA98, com e sem ativação metabólica, e negativos com a TA100 (36).

Alguns autores têm optado pelo estudo comparativo do potencial mutagénico de águas residuais industriais que afetam determinada água superficial face ao potencial mutagénico dessa mesma água, de forma a identificar possíveis fontes de poluição através da similaridade de resultados (34; 37-40). Cerná *et al.* (1996) utilizou a estirpe TA98 e os seus derivados para testar um efluente industrial no local da descarga e 6 Km a jusante do mesmo no Rio Labe. Os resultados mostraram, para as amostras do local da descarga, a existência de uma relação dose-resposta para a estirpe TA98 enquanto o número de revertentes detetado para as amostras a jusante do local de descarga era mais baixo, mas ainda assim significativo, relativamente ao controlo (39). Este resultado é indicativo da importância de uma escolha criteriosa dos locais de amostragem de modo a obter uma resposta sensível e fidedigna no teste de Ames. Para além disso, o teste de Ames foi utilizado para a deteção de atividade mutagénica em águas residuais industriais após o seu tratamento indicando que nem sempre este é suficiente para retirar todos os compostos potencialmente mutagénicos. Com efeito, Umbuzeiro *et al.* (2004)

relatarem resultados positivos em amostras de água tratada de uma indústria perto do rio Cristais que cumpria os parâmetros legais brasileiros (34).

Apesar das inúmeras vantagens do teste de Ames, alguns autores sugerem que o mesmo não é suficiente para avaliação do risco toxicológico das águas, devendo ser utilizado em conjunto com a análise química e/ou com outros ensaios de genotoxicidade (39; 41).

1.3.1 Fase pré-analítica - Métodos de Concentração de Águas

As amostras de água contêm misturas complexas de compostos orgânicos que se encontram, geralmente, em baixas concentrações. Assim, para que os compostos possam ser analisados, as amostras têm de passar por um processo de concentração destes compostos (42). A importância da concentração das amostras a analisar antes de se proceder a um bioensaio deve-se ao facto de organismos aquáticos da cadeia alimentar serem considerados de bioacumuladores destes agentes químicos, ou animais alimentados por estes, provocando assim efeitos genotóxicos quando consumidos pelo Homem. Também, no ser humano, uma exposição prolongada a uma água contaminada com estes compostos tóxicos em concentrações muito reduzidas pode ter o efeito genotóxico pela sua bioacumulação (42).

No caso dos testes de genotoxicidade utilizam-se previamente métodos de concentração em que seja mínima a alteração dos compostos orgânicos presentes na amostra (43-44). Vários fatores devem ser tidos em conta na escolha do método: a natureza dos componentes de interesse, o volume da amostra de água, o método de ensaio analítico ou de toxicidade que irá ser utilizado, o tipo de concentrado desejado, a pureza necessária de concentrado e a estabilidade do concentrado ou constituintes isolados durante a concentração (44). A principal dificuldade é encontrar um método único para concentrar toda a matéria orgânica na água, existindo sempre a possibilidade de uma substância altamente tóxica ser omitida porque o método de concentração utilizado não é adequado para isolar essa substância (44). Assim, os investigadores têm desenvolvido esforços para encontrar técnicas amigas do ambiente de modo a conseguirem extrair um amplo espectro de compostos em amostras com baixas concentrações (45). Deve ainda ser uma técnica simples, fácil de ser reproduzida, de modo que possa ser implementada em programas de monitorização (43). Sabe-se que em amostras de águas superficiais os métodos mais utilizados são a concentração por partição direta em solventes orgânicos ou adsorção e subsequente eluição (4).

A *United States Environmental Protection Agency* (EPA) indica a utilização de resinas adsorventes como o método com melhor relação custo-benefício para concentrar a matéria orgânica presente em matrizes aquosas (42). No caso dos compostos orgânicos semivoláteis em líquidos as técnicas mais utilizadas para extrair estes compostos são: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) (46). Durante o processo de extração, o produto químico X dissolvido na fase líquida A, é retirado quando a solução é colocada em contacto com uma segunda fase B, sendo A e B imiscíveis. A fase B pode ser um líquido, um gás ou um sólido. O analito X é assim distribuído pelas duas fases e de seguida é retirado da fase B para procedimentos subsequentes (46). Estudos comparativos revelam uma menor atividade mutagénica em amostras concentradas pelo método de LLE em comparação com resinas adsorventes tais como a XAD, o que levou os investigadores a preferirem métodos SPE para estudos desta natureza (47). O SPE também surgiu como alternativa ao LLE devido à sua simplicidade, baixo custo e facilidade de automatização e diminuição da quantidade de volume de solventes orgânicos (45). Na Tabela 1.2 faz-se um resumo dos métodos de concentração utilizados em alguns estudos realizados com águas superficiais. Como se

pode verificar, existem várias metodologias possíveis para concentração de amostras de água com o intuito de proceder a estudos de genotoxicidade.

Tabela 1.2 – Exemplos de métodos de concentração utilizados em estudos de genotoxicidade em águas superficiais

Local de amostragem	Ano	Tipo de amostra	Volume de amostra concentrado	Método de concentração	Referência
Rio Sora, Eslovénia	1995	Água de rio	10 L	Adsorção na resina XAD-2 a dois pH diferentes/ eluição com acetona	(38)
Rio Elba, República Checa	1996	Água de rio e efluentes industriais	1 L	Passagem em colunas com a resina Separon SE/ eluição com acetona	(39)
São Paulo, Brasil	2003	Água de rio e água tratada	60 L	Extração com XAD-4/ Eluição a pH neutro com metanol e a pH ácido com metanol e acetato de etilo	(48)
Rio Cristais, Brasil	2004	Água de rio, efluentes industriais, água tratada e sedimentos	1 L (efluentes industriais); 100 L (água de rio e tratada)	Efluentes industriais: LLE com mistura de metanol e diclorometano; Água de rio e tratada: extração com XAD-4 a pH neutro e acidificado/ eluição com metanol e diclorometano	(34)
Rio Pearl, China	2004	Água de rio e estuário	10 L	Adsorção nas resinas XAD-2 e XAD-4/ eluição com diclorometano e metanol 50:50	(49)
Estuário Yangtze, China	2005	Água de estuário	25 L	35 mL de XAD-2 e 15 mL de XAD-7/ eluição com acetona	(36)
Rio Yamuna, Índia	2005	Água do rio	15 L	Extração com XAD-4 e XAD-8/ eluição com acetona	(47)
Lago Trasimeno, Itália	2005	Água de lago, água em tratamento e água tratada	20 L	SPE com colunas C18/ eluição com acetato de etilo, diclorometano e metanol	(50)
Rio Kumho, Coreia	2008	Água de rio	-	Extração com XAD-2/ eluição com hexano/acetona (85:15), diclorometano, e acetato de etilo	(51)
Rio Edo, Japão	2010	Água de rio e água tratada	Água de rio: 20 L	Extração com XAD-2/ eluição com acetona:n-hexano	(52)

1.3.1.1 Método de Extração em Fase Sólida (SPE)

O método SPE é uma das técnicas de extração mais bem sucedidas devido à sua eficiência em purificar compostos químicos a partir de amostras líquidas e à sua versatilidade, uma vez que existem vários tipos diferentes de materiais adsorventes que determinam a natureza das interações para extração (53-54). Esta técnica é utilizada há cerca de cinquenta anos, para análise de componentes orgânicos existentes na água (45). O primeiro material adsorvente utilizado foi o carvão ativado. Devido à sua adsorção irreversível, modificação química na superfície do material e uma baixa recuperação, foi mais tarde substituído por novos materiais. Desde então houve a introdução de um amplo espectro de materiais, como por exemplo a resina XAD, até à introdução de colunas de extração vendidas comercialmente que são as mais utilizadas nos dias de hoje (45).

As vantagens do SPE em relação ao LLE são a utilização de menor quantidade de solventes, a poupança de tempo, a possibilidade de automatização e a variedade de interações possíveis (54-55). Assim, é utilizado tanto para remover possíveis interferentes, como para concentração seletiva ou isolamento de compostos (54; 56). A técnica consiste na remoção de compostos químicos a partir de uma amostra líquida através da retenção num material adsorvente sólido e posterior recuperação desses mesmos compostos por eluição (56). De um modo geral, o SPE pode ser dividido em quatro passos fundamentais (Figura 1.2) (46; 55-56):

Condicionamento da coluna ou do disco – Cada material adsorvente necessita de um pré-tratamento/ condicionamento para ativá-lo ou prepará-lo para reter o analito em estudo. Os materiais adsorventes hidrofóbicos requerem duas etapas de tratamento, com um solvente orgânico seguido de uma lavagem com água (56).

Passagem da amostra/ adsorção dos analitos: A matriz líquida passa pela coluna ou disco, ficando os analitos adsorvidos no material.

Lavagem: Retirar os compostos ou materiais indesejados com ligações fracas ao material adsorvente, se necessário. A coluna é lavada com uma solução mais forte que a da matriz da amostra mas mais fraca que a dos compostos de interesse (55).

Eluição: Lavagem da coluna com um solvente de forma a retirar todos os compostos de interesse. O produto da eluição é recolhido e tratado para posterior análise/ teste (55).

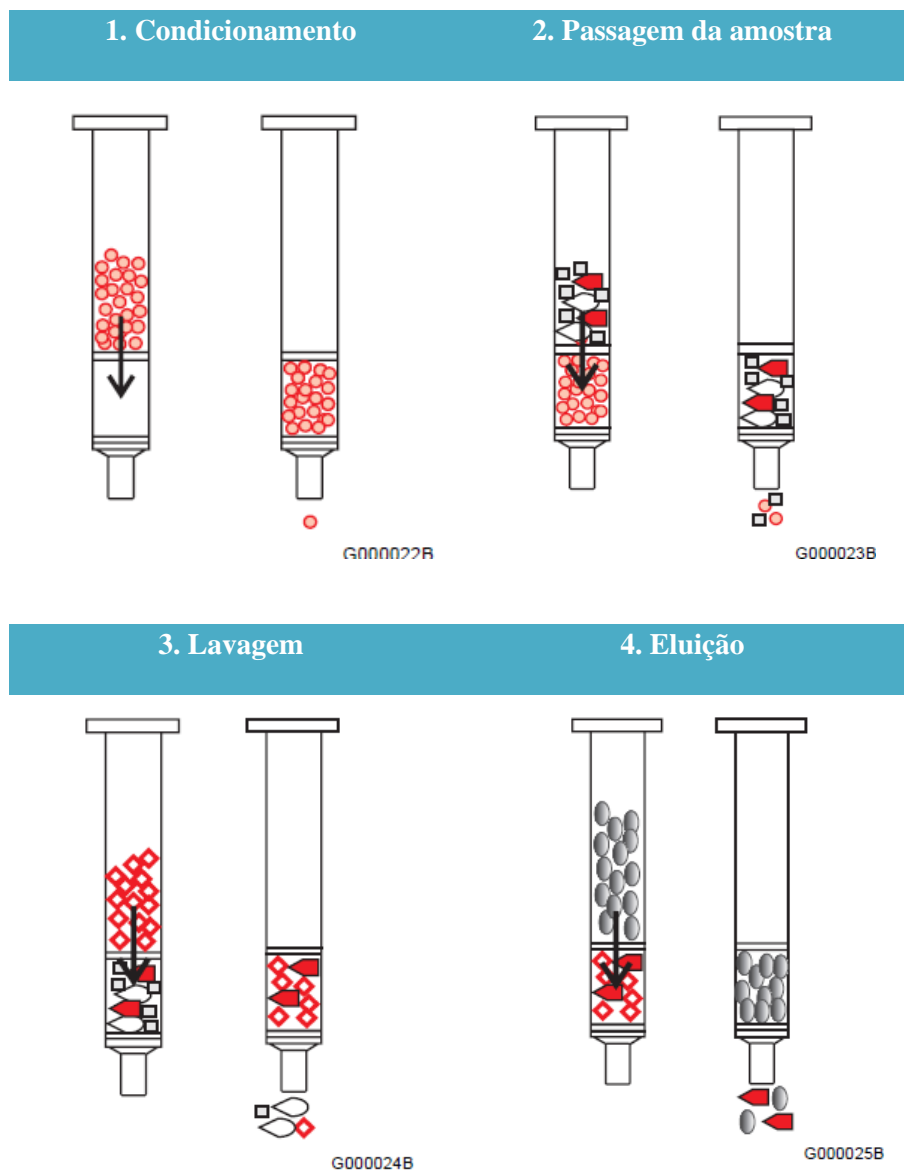


Figura 1.2 - Esquema dos quatro passos do método SPE (adaptado) (55)

Em ensaios com amostras de água fortificada (porção de água que contém uma concentração conhecida dos analitos a serem analisados) a recuperação é calculada através da comparação entre a concentração do composto no eluído e a concentração na amostra inicial (46).

O SPE pode ser classificado em quatro tipos diferentes consoante as interações existentes entre os analitos e o material adsorvente (Figura 1.3) (55).

Fase reversa	Fase normal	Troca iónica	Adsorção
<ul style="list-style-type: none"> •Matriz líquida polar •Material adsorvente apolar 	<ul style="list-style-type: none"> •Matriz líquida apolar •Material adsorvente polar 	<ul style="list-style-type: none"> •Atração eletroestática de elementos com carga 	<ul style="list-style-type: none"> •Interações de compostos com materiais não modificados

Figura 1.3 - Os tipos de SPE consoante as interações existentes entre os analitos e o material adsorvente (adaptado) (55)

De uma forma geral, os compostos polares são facilmente adsorvidos a um material polar, sendo retirados de um ambiente apolar, e são eluídos com um solvente polar. O oposto é verdadeiro para os compostos apolares (54).

Os avanços na investigação procuram materiais adsorventes cada vez mais seletivos e de fácil utilização que resultam em procedimentos simplificados e na diminuição de possíveis erros (57). No caso da utilização do SPE em amostras aquosas em que se pretende retirar compostos orgânicos, o método classifica-se de fase reversa (55). A maioria dos compostos orgânicos tem uma estrutura que permite a adsorção em materiais apolares ligando-se por ação de forças de *Van-der-Waals* (54-55; 57). São exemplos destes materiais as sílicas modificadas tais como a C18 (octadecil) e a C8 (octil) (54). A sílica é caracterizada por possuir grupos silanol hifrofílicos na superfície que são quimicamente modificados com grupos funcionais alquilo hidrofóbicos ou arilos (Figura 1.4) (55). As sílicas modificadas têm sido o material adsorvente mais utilizado no ensaio SPE (46). São materiais com uma seletividade aparentemente baixa, uma vez que os seus grupos funcionais interagem com quase todos os compostos apolares (54).

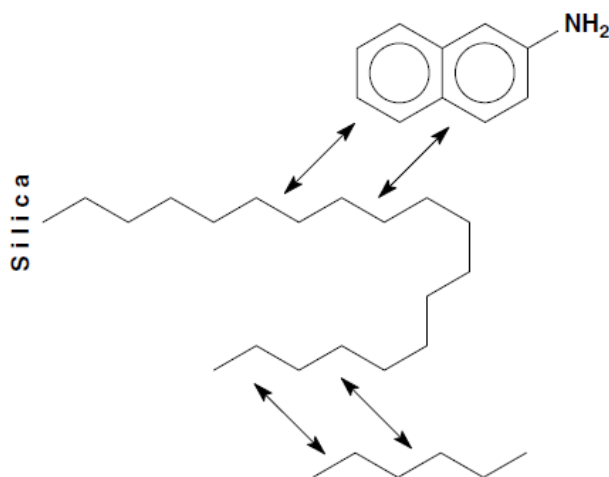


Figura 1.4 - Interações existentes entre o analito e o material adsorvente de sílica modificada C18 em SPE de fase reversa por ação de forças de Van-der-Waals (adaptado) (46)

2. Objetivos

O presente estudo teve como objetivo geral a implementação do teste de Ames para monitorização e controlo da toxicidade de águas naturais através da avaliação das suas propriedades mutagénicas.

Os objetivos específicos foram os seguintes: i) validar um método de concentração de água para extração de compostos orgânicos; ii) levar a cabo a implementação e validação do teste de Ames no laboratório; iii) aplicar o teste de Ames à avaliação das propriedades mutagénicas de águas colhidas em vários pontos do Estuário do Sado e iv) procurar estabelecer uma relação entre o potencial mutagénico das amostras e o seu conteúdo em contaminantes sempre que essa informação estivesse disponível.

3. Materiais e Métodos

3.1 Material e Equipamento

Os materiais e equipamentos necessários à execução do presente trabalho experimental estão apresentados nas tabelas do Anexo A, correspondendo às três fases do projeto.

Na análise cromatográfica utilizou-se um sistema de cromatografia gasosa com detetor de massa acoplado (GC-MS) Varian 4000. A coluna para GC foi a VF-5ms para pesticidas (30m * 0,25 mm * 0,25 µm) (Varian, Palo Alto, CA, EUA). O injetor do cromatógrafo foi mantido a uma temperatura de 250°C. O modo de injeção foi *splitless* com um volume de 10 µL de solução. Como fase móvel foi utilizado o hélio com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. O modo de ionização utilizado foi o impacto eletrônico. Para o detetor de massa foram utilizadas as seguintes temperaturas: *trap*: 240°C; *manifold*: 80°C; *transferline*: 230°C.

3.2 Reagentes, solventes e soluções

3.2.1 Validação do método SPE-GC-MS e concentração das amostras de água

As soluções padrão seguintes foram adquiridas comercialmente e utilizadas na preparação de uma solução de concentração intermédia:

- Terbutilazina, 10 ng.µL⁻¹ em metanol (MeOH) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanha);
- Alacloro, 100 ng.µL⁻¹ em MeOH (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanha);
- Pireno, 10 ng.µL⁻¹ em ciclohexano (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanha);
- Benzo(a)antraceno, 100 ng.µL⁻¹ em acetonitrilo (ACN) (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemanha).

A solução de concentração intermédia, utilizada na validação da metodologia SPE, foi preparada com a mistura de cada uma das soluções anteriores numa concentração de 1 mg.L⁻¹. Adicionou-se 50 µL das soluções de alacloro e de benzo(a)antraceno e 500 µL das soluções de pireno e de terbutilazina num balão de 5 mL e perpez-se com acetato de etilo (EtOAc). Todas as soluções foram armazenadas a 4°C em frascos de vidro âmbar ao abrigo da luz.

Durante a validação do método SPE-GC-MS e concentração das amostras de água foram utilizados os seguintes solventes e reagentes:

- Acetato de etilo para GC (cromatografia gasosa) (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Acetona para GC (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Acetonitrilo para GC (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Ácido clorídrico (HCl) 5 mol.L⁻¹
- Água ultrapura obtida num sistema Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, EUA);
- Diclorometano (DCM) para GC (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (AppliChem, Darmstadt, Alemanha)
- Metanol para GC (Merck, Darmstadt, Alemanha)
- N-hexano para GC (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.2.2 Aplicação do Teste de Ames

Na aplicação do Teste de Ames foram preparadas três soluções para utilização como controlo positivo:

- Dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), 10 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ em DMSO (AppliChem, Darmstadt, Alemanha);
- 2-nitrofluoreno (2NF) (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,2 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ em DMSO (AppliChem, Darmstadt, Alemanha);
- Azida de sódio (NaN_3) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), 0,1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ em água ultrapura.

Os meios e soluções utilizados no crescimento bacteriano das estirpes TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* foram preparados segundo o descrito por Maron e Ames (1983) (27). Comercialmente foram adquiridos os seguintes produtos:

- Ampicilina sal sódico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- D-biotina, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- L-histidina, monohidrócloro monohidratada $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA);
- S9 mix, 10% (Moltox, Glessen, Alemanha).

3.3 Colheita das Amostras de Água

As amostras de água foram colhidas a 26 de setembro de 2015 em seis pontos distintos do Estuário do Sado (Figura 3.1) pela APORVELA (Associação Portuguesa de Treino de Vela). Posteriormente foram armazenadas a 4°C, protegidas da luz.

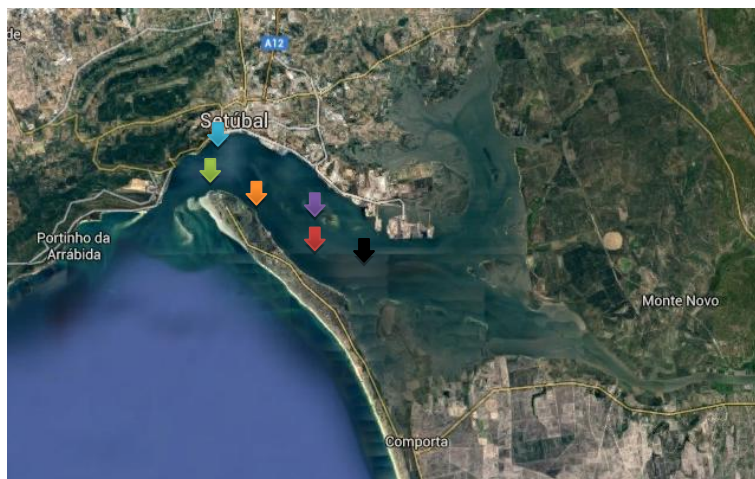


Figura 3.1 - Imagem satélite do Estuário do Sado. As setas indicam os locais de colheita das amostras de água (A1 – azul; A2 – verde; A3 – laranja; A4 – roxo; A5 – vermelho e A6 – preto)

3.4 Validação da Metodologia SPE

Antes da aplicação do Teste de Ames, foi utilizado um método de concentração das amostras de água colhidas no Estuário do Sado para verificação do seu potencial mutagénico. Uma vez que a metodologia não estava validada, procedeu-se a ensaios para determinar a taxa de recuperação em

matrizes aquosas fortificadas aplicando várias metodologias de concentração pelo método SPE e posterior determinação no GC-MS (Figura 3.2).

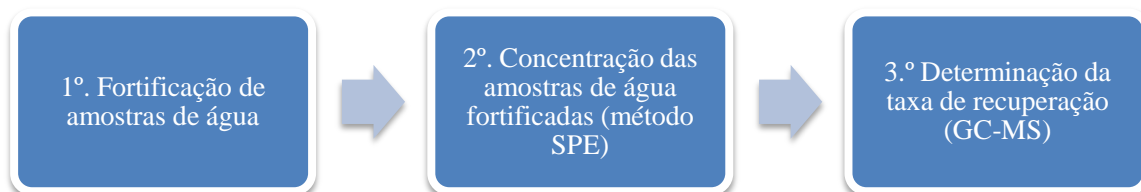


Figura 3.2 - Etapas do processo de validação da Metodologia SPE

3.4.1 Estudo dos Parâmetros de Validação da Metodologia SPE-GC-MS

De forma a obter resultados com a qualidade exigida, o método SPE-GC-MS foi submetido ao estudo dos seguintes critérios: seletividade, linearidade, limiares analíticos e exatidão (58).

Inicialmente injetaram-se no GC-MS (nas condições descritas em 3.1) as soluções dos quatro compostos individuais e em mistura para determinação dos tempos de retenção (t_r) de cada um dos analitos.

As curvas de calibração dos compostos químicos utilizados na fortificação de amostras de água foram determinadas através da preparação de soluções padrão de calibração. Utilizaram-se balões de 1 mL onde se fizeram seis diluições, em EtOAc, de uma solução mistura dos dois pesticidas (terbutilazina, alacloro) e dos dois HAPs [pireno e benzo(a)antraceno] numa concentração final de 1 mg.L^{-1} . As soluções foram transferidas para *vials* de 1,5 mL e injetadas diretamente no sistema GC-MS nas mesmas condições. Tendo em conta a utilização de um fator de concentração de 1000 em amostras aquosas a gama de concentração estudada nas curvas de calibração é apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Concentrações da solução mistura utilizadas na elaboração das curvas de calibração

	V (μL) retirado da solução (1 mg.L^{-1})	C ($\mu\text{g.L}^{-1}$) injeção direta	C ($\mu\text{g.L}^{-1}$) aquoso (SPE)
Ponto 1	25	25	0,025
Ponto 2	58	58	0,058
Ponto 3	100	100	0,100
Ponto 4	150	150	0,150
Ponto 5	200	200	0,200
Ponto 6	250	250	0,250

De seguida estabeleceram-se gráficos de calibração para cada um dos quatro compostos, com a área do respetivo pico em função da concentração. Para o estudo da exatidão, foram injetadas no GC-MS soluções mistura com as concentrações dos pontos 1, 3 e 6 da curva de calibração, em triplicado. Para o estudo dos limiares analíticos, foram injetadas soluções mistura com a concentração do ponto 1 da curva de calibração (12 vezes).

3.4.2 Fortificação de Amostras de Água

As amostras de água fortificada foram preparadas em balões de 1000 mL (2000 mL para volumes maiores) através da adição de 100 µL (200 µL para volumes de 2000 mL) da solução de concentração intermédia, a água ultrapura, até perfazer o volume final do balão. Foram posteriormente acidificadas com uma solução de HCl (5 mol.L⁻¹) até atingirem pH 2. De seguida, foram transferidas para frascos de vidro de âmbar de 1000 mL (2500 mL) de forma a evitar a degradação dos compostos por ação da luz. Os ensaios de concentração das amostras de água fortificada foram realizados sempre após a preparação das mesmas.

3.4.3 Método de Extração em Fase Sólida (SPE)

O SPE foi realizado em quatro etapas consecutivas recorrendo ao sistema Manifold para SPE e com a utilização de colunas C18: condicionamento, passagem da amostra, secagem das colunas e eluição dos compostos.

O condicionamento das colunas foi feito através da passagem de 6 mL de MeOH seguidos de 6 mL de água ultrapura, por ação da gravidade. De seguida, cada uma das amostras de água passou por uma coluna, com recurso a um sistema de vácuo. Foram testadas algumas condições como o volume da amostra e a adição de ACN para lavagem do frasco.

As colunas foram secas sob fluxo de azoto durante 15 ou 30 minutos, de forma a retirar quaisquer vestígios de água. A extração dos compostos orgânicos foi realizada com recurso a solventes orgânicos. Foram testados vários solventes. A solução foi concentrada por ação do fluxo de azoto até à secura. De seguida, o concentrado foi redissolvido em EtOAc com um fator de concentração de 1000 (volume de água de 1000 mL com reconstituição final em 1 mL). O reconstituente final foi colocado num *vial* de vidro âmbar de 1,5 mL e armazenado a 4°C até utilização.

A validação da melhor condição possível para o método SPE através da determinação da taxa de recuperação dos quatro compostos em matrizes aquosas, foi feita através da realização de diversos ensaios (Tabela 3.2).

Tabela 3.2- Ensaios de validação da metodologia SPE com descrição das variáveis em estudo

N.º do Ensaio	pH da água	Condicionamento dos cartuchos	Fluxo de passagem da água (mL.min ⁻¹)	Tempo de secagem (min)	Eluição	Outras condições
1	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	4,69	30	2x 5 mL DCM/ MeOH 2:1	-
2	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	5,75	30	2x 5 mL DCM/ MeOH 2:1	Adição de 75 mL de ACN à amostra
3	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	3,77	15	2x 5 mL DCM/ MeOH 2:1	-
4	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	4,98	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	-
5	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	3,77	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	Adição de 75 mL de ACN à amostra
6	2	10 mL DCM/ MeOH 50:50; 6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	7,79	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	Adição de 75 mL de ACN à amostra
7	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	5,46	30	5 mL DCM + 5 mL MeOH	Adição de 75 mL de ACN à amostra
8	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	7,79	30	5 mL n-hexano + 5 mL MeOH	Adição de 75 mL de ACN à amostra
9	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	6,45	30	10 mL n-hexano/ MeOH 50:50	Adição de 75 mL de ACN à amostra
10	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	6,94	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	-
11	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	7,87	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	Adição de 25 mL de ACN à amostra
12	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	7,19	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	Adição de 50 mL de ACN à amostra
13	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	9,26	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	Lavagem do frasco com 25 mL de ACN
14	2	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	9,80	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	Lavagem do frasco com 25 mL de H ₂ O:ACN 3:1
15	Normal	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	8,20	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	Lavagem do frasco com 25 mL de H ₂ O:ACN 3:1
16	Neutro	6 mL MeOH; 6 mL água ultrapura	7,04	30	10 mL DCM/ MeOH 50:50	Lavagem do frasco com 25 mL de H ₂ O:ACN 3:1

3.4.4 Determinação da Taxa de Recuperação

Os extratos concentrados em EtOAc foram injetados diretamente no sistema GC-MS nas condições descritas em 3.1. Analisaram-se os cromatogramas, retirando o valor da área do pico determinado para cada um dos quatro compostos em estudo. Estes valores foram calculados através das curvas de calibração e determinou-se a taxa de recuperação (Anexo B).

3.5 Concentração das Amostras de Água para Aplicação do Teste de Ames

Depois da escolha do método SPE com a melhor taxa de recuperação dos quatro compostos, procedeu-se à aplicação da mesma nas amostras reais colhidas no Estuário do Sado.

Filtrou-se 5000 mL de cada uma das amostras em sistema de vácuo através de uma membrana de celulose 0,45 μm . De seguida, foram acidificadas a pH 2 e mantidas a 4°C, ao abrigo da luz, até à sua concentração no dia seguinte.

As seis amostras de água reais (A1, A2, A3, A4, A5 e A6) foram concentradas juntamente com duas amostras fortificadas (F1 e F2), conforme o descrito em 3.4.1, para um volume de 5000 mL. O método SPE utilizado está descrito na Figura 3.3.

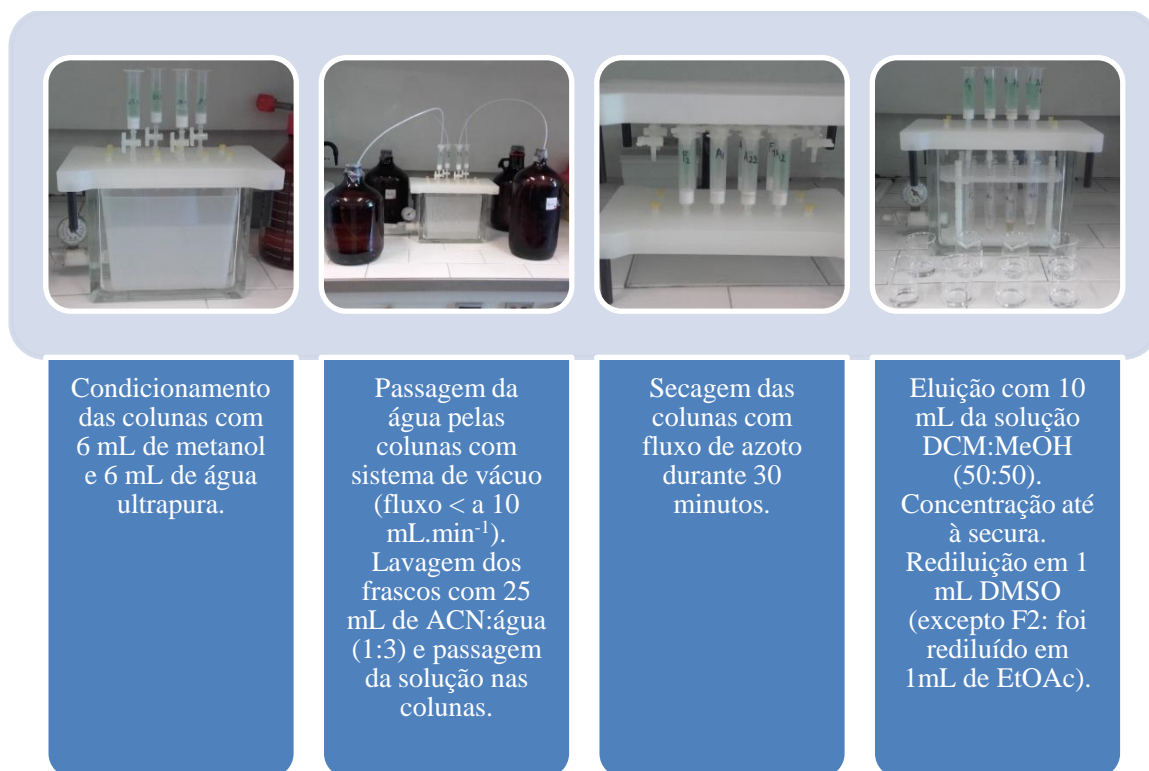


Figura 3.3 – Método SPE utilizado na concentração das amostras de água

Os concentrados das amostras foram guardados a -20°C protegidos da luz até serem utilizados no teste de Ames. A amostra F2 foi injetada no GC-MS para se verificar a recuperação nas amostras fortificadas.

3.6 Teste de Ames

Utilizaram-se as estirpes de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100 (gentilmente cedidas pelo Doutor Michel Kranendonk, *Center for Toxicogenomics & Human Health - NOVA Medical School* / Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa). Os ensaios de reisolamento das estirpes, assim como a confirmação das características genéticas e curva dose/ resposta foram realizados nos laboratórios do referido Centro de Investigação.

3.6.1 Reisolamento das Estirpes a partir do *Stock Master*

As estirpes de *Salmonella typhimurium* encontravam-se criopreservadas a -80°C na forma de um *stock master* com 10% de DMSO. Para o reisolamento de cada estirpe mergulhou-se a ança previamente esterilizada no *stock master* e fez-se um riscado numa placa com meio *nutrient broth* (NB) com ampicilina a 25% (A25). As placas foram incubadas durante 24h, a 37°C.

De seguida, retiraram-se 5 colónias individualizadas de cada placa com a ajuda de uma ança previamente esterilizada e ressuspendeu-se cada uma delas em 200 µL de tampão fosfato-salino (PBS).

3.6.2 Confirmação das Características Genéticas das Estirpes

Para os testes fenotípicos foram colocados 5 µL da suspensão de células de cada um dos candidatos (numerados de 1 a 5) em quatro meios seletivos e observou-se o crescimento após incubação em estufa a 37°C. Os meios utilizados para os testes fenotípicos foram:

- Placa meio *Vogel Bonner* (VB) suplementada com L-histidina, D-biotina e ampicilina (incubação durante 48h);
- Placa MacConkey (incubação durante 14-16h);
- Placa VB suplementada com D-biotina (incubação durante 48h);
- Placa VB suplementada com L-histidina (incubação durante 48h).

Após seleção dos candidatos de cada estirpe com as características pretendidas fez-se a sua inoculação, a partir da placa *master*, em tubos de ensaio com 5 mL de meio NB líquido com A25 que foram incubados na estufa a 37°C com agitação (210 rpm) durante 16 horas. Adicionou-se 450 µL de DMSO a cada tubo, distribuiu-se em alíquotas de 500 µL e foram criopreservadas a -80°C.

De seguida fez-se um teste de mutagenicidade, sem ativação metabólica, para escolha de um candidato por estirpe. Os candidatos a testar foram inoculados (20 µL de *stock* da cultura) num tubo de ensaio com 5 mL de meio NB⁻ líquido e colocados numa incubadora com agitação à temperatura de 37°C, a 210 rpm, durante 16 horas. Foi também colocado um tubo com 2 mL NB⁻ para controlo de esterilidade do meio.

As placas com meio VB foram deixadas à temperatura ambiente e devidamente marcadas. Os tops de agar suplementados com biotina e histidina foram liquefeitos, deixando-os ferver em banho-maria durante 5 minutos. Após arrefecerem e atingirem os 60°C, foram transferidos para o banho seco de forma a mantê-los aproximadamente a 45°C durante o ensaio.

As soluções dos controlos positivos foram preparadas como descrito em 3.2.2.

Para cada uma das estirpes incluiu-se um controlo negativo e um controlo positivo, em duplicado. Para o controlo negativo, adicionou-se a cada tubo de top agar suplementado com histidina e biotina 100 μL de cultura bacteriana em meio líquido. Para o controlo positivo, para além da cultura bacteriana, adicionou-se 10 μL do mutagénico: 2NF para a TA98 e NaN_3 para a TA100.

Espalhou-se na placa com movimentos circulares e deixou-se secar. Após o ensaio, as placas foram colocadas numa incubadora a 37°C durante 48h. Procedeu-se, após esse período, à contagem das colónias revertentes em cada placa.

3.6.3 Curva Dose-Resposta

Para cada uma das estirpes, TA98 e TA100 foram testadas 5 diluições dos controlos positivos com e sem S9 mix, em triplicado. Todo o procedimento relativo ao teste de Ames foi realizado de acordo com o descrito no ponto anterior para o teste de mutagenicidade. Para além disso, o ensaio foi realizado com e sem adição do sistema exógeno de metabolização S9. A solução S9 mix foi reconstituída conforme as indicações do fabricante e colocada de imediato em gelo. Adicionou-se a cada tubo de top agar suplementado com histidina e biotina 100 μL de cultura bacteriana em meio líquido, 500 μL de S9 mix nos ensaios com ativação metabólica e os controlos positivos nas concentrações indicadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Concentrações utilizadas para obtenção da curva dose-resposta das estirpes TA98 e TA100, com os respetivos controlos positivos, com e sem ativação metabólica

	2-NF (TA 98 sem S9 mix)	NaN_3 (TA 100 sem S9 mix)	DMBA (TA 98 e TA 100 com S9 mix)
Ponto da curva	C ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	C ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	C ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)
1	0	0,0	0
2	1	0,2	25
3	2	0,5	50
4	3	1,0	75
5	4	1,5	100

Espalhou-se na placa com movimentos circulares e deixou-se secar. Após o ensaio, as placas foram colocadas numa incubadora a 37°C durante 48h. Procedeu-se à contagem das colónias.

3.6.4 Aplicação do Teste de Ames para identificação do potencial mutagénico de amostras de água, após concentração

As estirpes TA98 e TA100 foram inoculadas (20 μL de *stock* da cultura) num tubo de ensaio com 5 mL de meio NB⁻ líquido e colocadas numa incubadora com agitação à temperatura de 37°C a 210 rpm durante 16 horas. Para controlo da esterilidade, foi colocado um tubo com 2 mL de NB⁻.

As placas com meio VB foram deixadas à temperatura ambiente e devidamente marcadas. Os tops de agar suplementados com biotina e histidina foram liquefeitos, deixando-os ferver em banho-maria durante 5 minutos. Após arrefecerem e atingirem os 60°C, foram transferidos para o banho-maria de forma a mantê-los a aproximadamente 45°C durante o ensaio.

As soluções dos controlos positivos foram preparadas como descrito em 3.2.2. Nos ensaios com ativação metabólica, a solução S9 mix foi reconstituída conforme as indicações do fabricante e colocada de imediato em gelo.

Adicionou-se a cada tubo de top agar suplementado com histidina e biotina 100 µL de cultura bacteriana em meio líquido, 500 µL de S9 mix nos ensaios com ativação metabólica e a amostra a testar ou o controlo positivo (Figura 3.4).

Espalhou-se na placa com movimentos circulares e deixou-se secar. Colocou-se numa incubadora a 37°C durante 48h e procedeu-se à contagem das colónias.

Nos ensaios sem ativação metabólica, cada uma das seis amostras (A1, A2, A3, A4, A5 e A6) foi testada em três concentrações diferentes, em triplicado, adicionando-se 40 µL, 20 µL ou 10 µL do concentrado obtido pelo método SPE ao tubo de top agar suplementado com histidina e biotina. A amostra fortificada (F1) foi testada em cinco concentrações diferentes, em triplicado, adicionando-se 40 µL, 20 µL, 10 µL, 5 µL ou 1 µL.

Nos ensaios com ativação metabólica, utilizaram-se as mesmas concentrações mas em duplicado. As concentrações foram definidas com base no estudo realizado por Aleem e Malik (2005) (47). Para cada uma das estirpes, com e sem ativação metabólica, foi utilizado como controlo positivo o mesmo composto do ensaio da curva dose-resposta na concentração correspondente ao ponto 3.

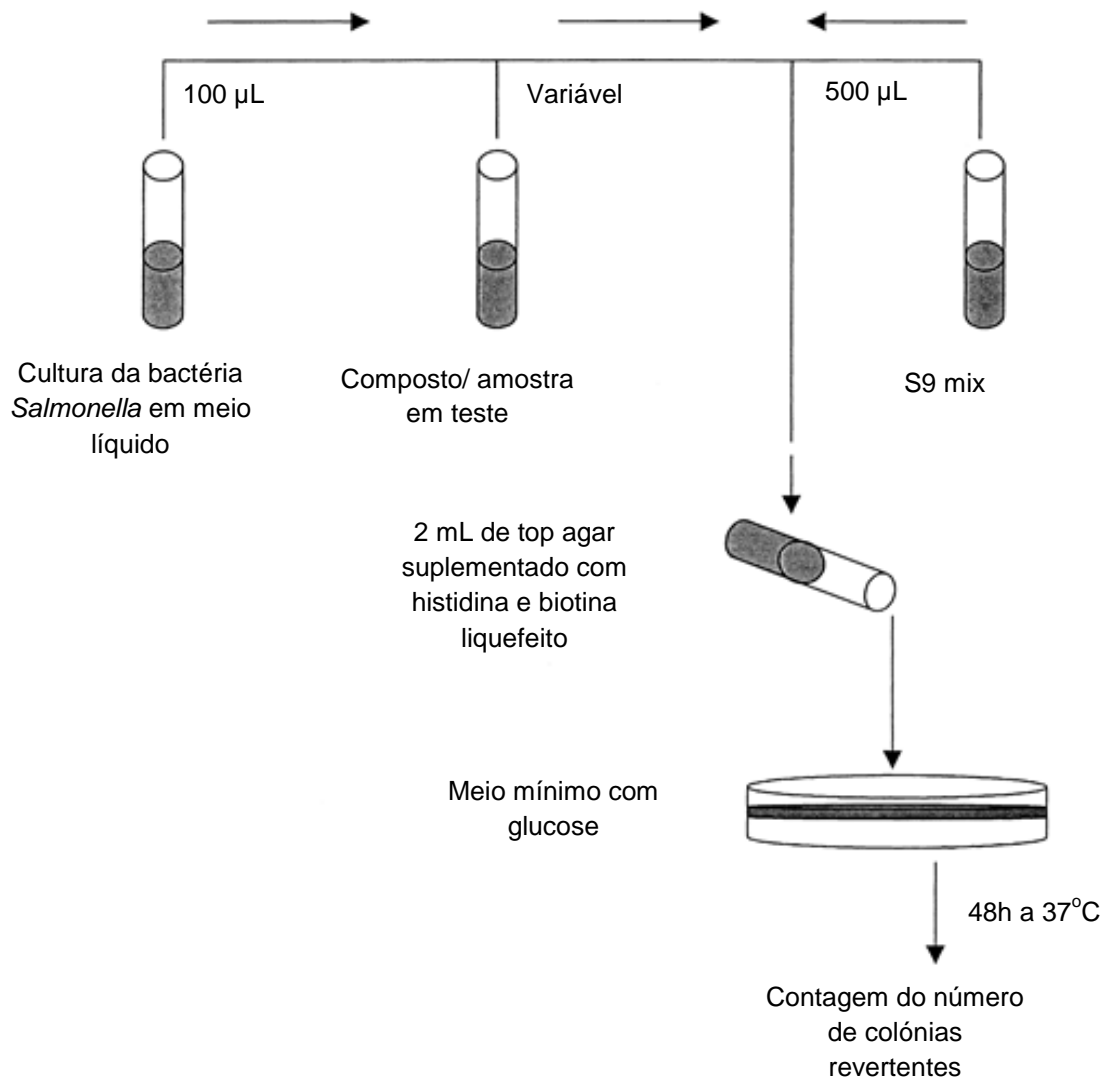


Figura 3.4 - Diagrama dos passos realizados nos ensaios do teste de Ames (adaptado) (23)

Depois da incubação, procedeu-se à contagem do número de colónias em cada uma das placas. O número de colónias induzidas corresponde à subtração entre o número de revertentes com mutagénico e o número de revertentes sem mutagénico (controlo negativo). Os resultados foram avaliados segundo critérios não estatísticos descritos em 1.2.1.1.

4. Resultados

4.1 Validação do Método Analítico: SPE-GC-MS

Neste ponto, serão apresentados os resultados obtidos na validação do método analítico, relativos aos critérios de seletividade, linearidade, limiares analíticos e de exatidão.

4.1.1 Estudo da Seletividade

O primeiro passo para a validação da metodologia envolveu a otimização das condições de análise no GC-MS para obtenção de um cromatograma com uma boa separação dos quatro compostos (terbutilazina, alacloro, pireno e benzo(a)antraceno) a quantificar (Figura 4.1).

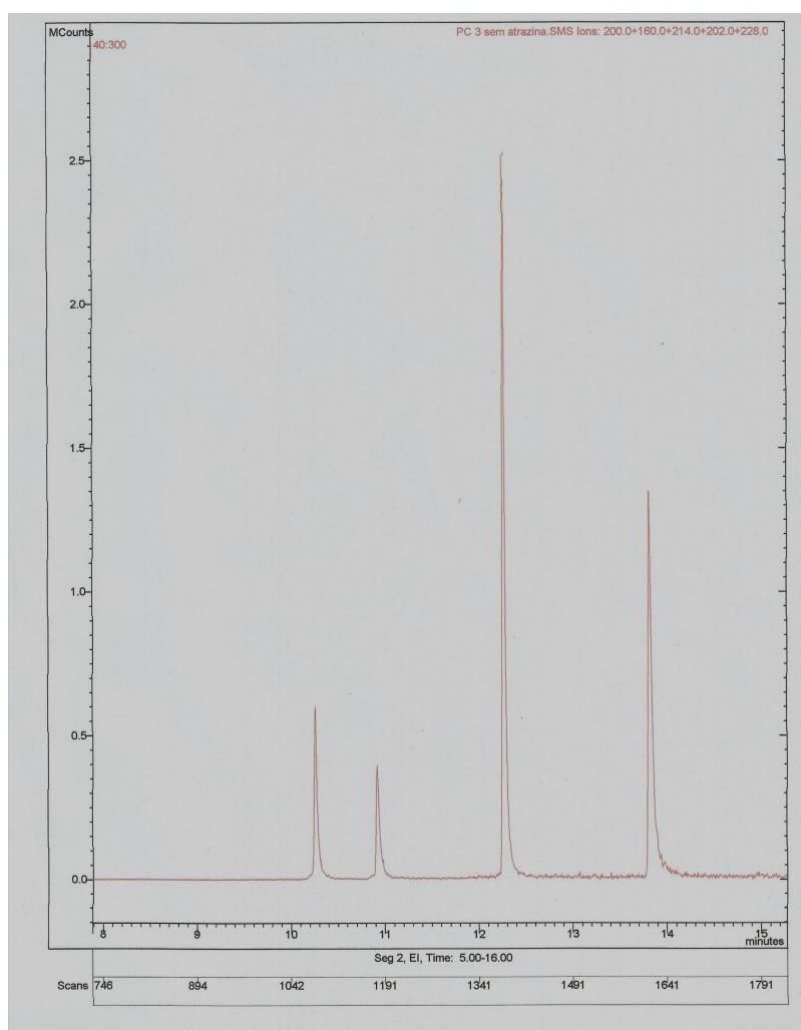


Figura 4.1 – Cromatograma obtido por injeção líquida da solução contendo os 4 compostos ($250 \mu\text{g.L}^{-1}$) no sistema de GC-MS

Pode-se considerar que a metodologia é seletiva uma vez que a injeção dos quatro compostos utilizados na fortificação das matrizes aquosas, tanto individualmente como em mistura, demonstram que o t_r é idêntico na leitura dos cromatogramas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Comparação entre a média do t_r de cada composto na injeção da solução individual e a média da solução mistura, em minutos

Composto	Média do t_r da injeção da solução individual (min)	Média do t_r da injeção da solução mistura (min)
Terbutilazina	10,23	10,23
Alacloro	10,89	10,89
Pireno	12,23	12,24
Benzo(a)antraceno	13,78	13,78

4.1.2 Estudo da Linearidade

As curvas de calibração foram obtidas por representação gráfica das áreas correspondentes a cada um dos quatro picos do cromatograma em função da respetiva concentração.

A linearidade das curvas de calibração foi avaliada através do cálculo dos coeficientes de correlação (r) de forma a obter um r de aproximadamente 0,995, ou superior. Foi desprezado um ponto em cada uma das quatro curvas (Figura 4.2).

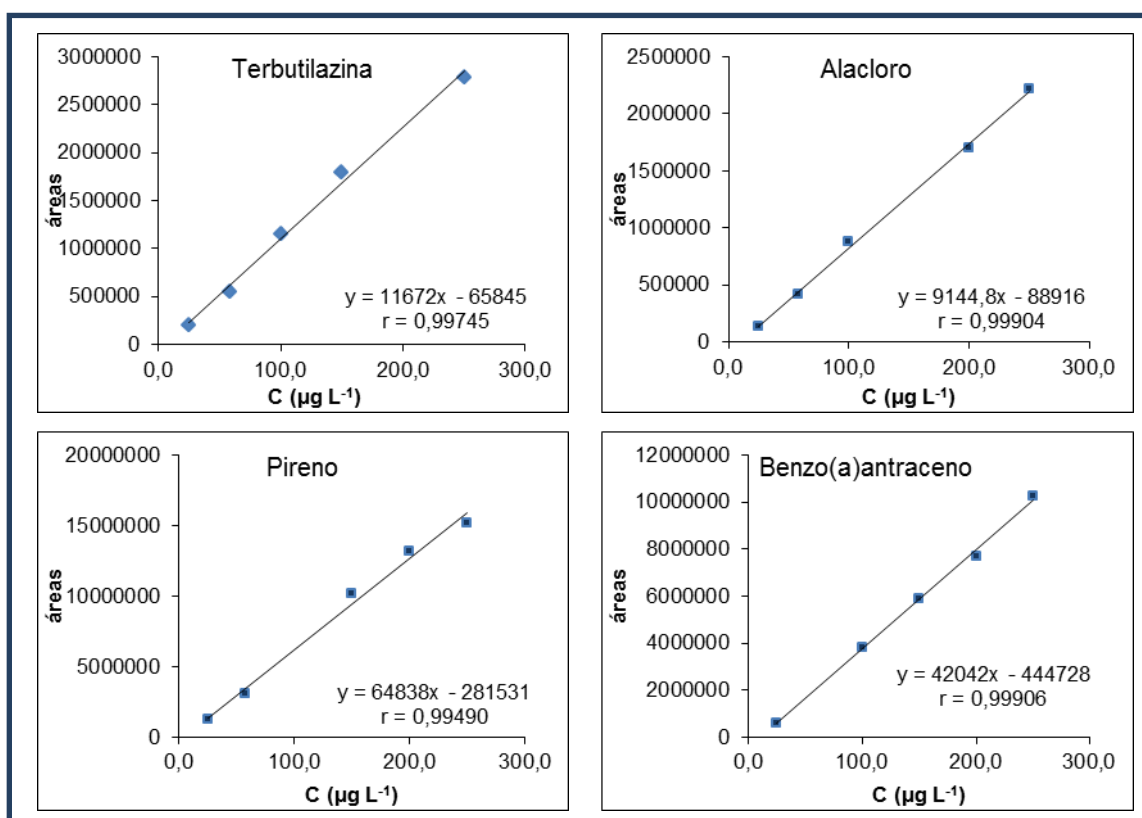


Figura 4.2 - Representação gráfica das curvas de calibração dos quatro compostos utilizados na fortificação das matrizes aquosas, soluções em EtOAc com concentrações de 25 – 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Como se pode verificar nas representações gráficas da Figura 4.2, todos os compostos originaram curvas de calibração lineares, com um r de aproximadamente 0,995 ou superior.

4.1.3. Estudo dos Limites Analíticos

A validação do limite de quantificação (LQ), ou seja, a menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito com uma determinada exatidão e precisão, implicou que fossem cumpridas as seguintes condições: coeficiente de variação (CV) e erro relativo (Er) inferiores a 25% (56). O valor de 25% foi decidido com base nos critérios de aceitação definidos na legislação para a água destinada ao consumo humano relativamente aos HAPs e pesticidas (59).

Considerou-se o LQ da metodologia como o extremo inferior da curva de calibração que corresponde a uma concentração de $0,025 \mu\text{g.L}^{-1}$ na solução aquosa. O CV e o Er foram calculados, utilizando o valor de 12 ensaios, através das seguintes equações:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

(equações 4.1 e 4.2)

$$Er = \left(\frac{\bar{x} - LQ}{LQ} \right) \times 100$$

Em que s se refere ao desvio padrão e \bar{x} à média dos valores obtidos por análise cromatográfica dos 12 ensaios.

Como se pode verificar pelos valores apresentados na Tabela 4.2, os valores de CV e de Er são inferiores a 25% pelo que se pode aceitar o LQ de $0,025 \mu\text{g.L}^{-1}$ para todos os compostos. Considerando-se que o valor do limite de deteção (LD) é igual a $LQ/3$, então o LD para esta metodologia é de aproximadamente $0,0089 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Tabela 4.2 - Resultados obtidos para a validação do LQ para os compostos utilizados na solução mistura: média, desvio padrão, CV e Er dos 10 padrões analisados

	Média \bar{x} ($\mu\text{g L}^{-1}$) ¹⁾	Desvio padrão s ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CV (%)	Er (%)
Terbutilazina	0,0255	0,0023	9,0	2,2
Alacloro	0,0259	0,0022	8,6	3,5
Pireno	0,0272	0,0026	9,7	8,7
Benzo(a)antraceno	0,0273	0,0024	8,7	9,2

4.1.4 Estudo da Exatidão

A exatidão é calculada pela razão entre a quantidade de substância adicionada e a quantidade de substância recuperada, expressa em percentagem (recuperação) (58). Neste estudo foi calculada a exatidão de cada uma das concentrações, correspondentes aos extremos, inferior e superior, da curva de calibração, e a um ponto intermédio. Os resultados da recuperação média da análise cromatográfica das injeções diretas no sistema GC-MS estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Valores da recuperação média da injeção direta no sistema GC-MS dos pontos 1, 3 e 6 da curva de calibração em triplicado, para o estudo da exatidão

Ponto da curva $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperação média da terbutilazina (%)	Recuperação média do alacoloro (%)	Recuperação média do pireno (%)	Recuperação média do benzo(a)antraceno (%)
1 (25)	80,97	93,91	92,57	88,37
3 (100)	92,67	124,94	114,96	109,58
6 (250)	122,51	118,75	100,75	106,41

Analisando os resultados obtidos, a metodologia cumpre o critério estipulado para a exatidão: % de recuperação com erro não superior a 25%, ou seja, recuperação média entre 75% e 125%.

4.2 Determinação da Taxa de Recuperação pelo Método SPE-GC-MS

Os resultados da recuperação dos ensaios descritos na Tabela 3.2 estão representados graficamente na Figura 4.3.

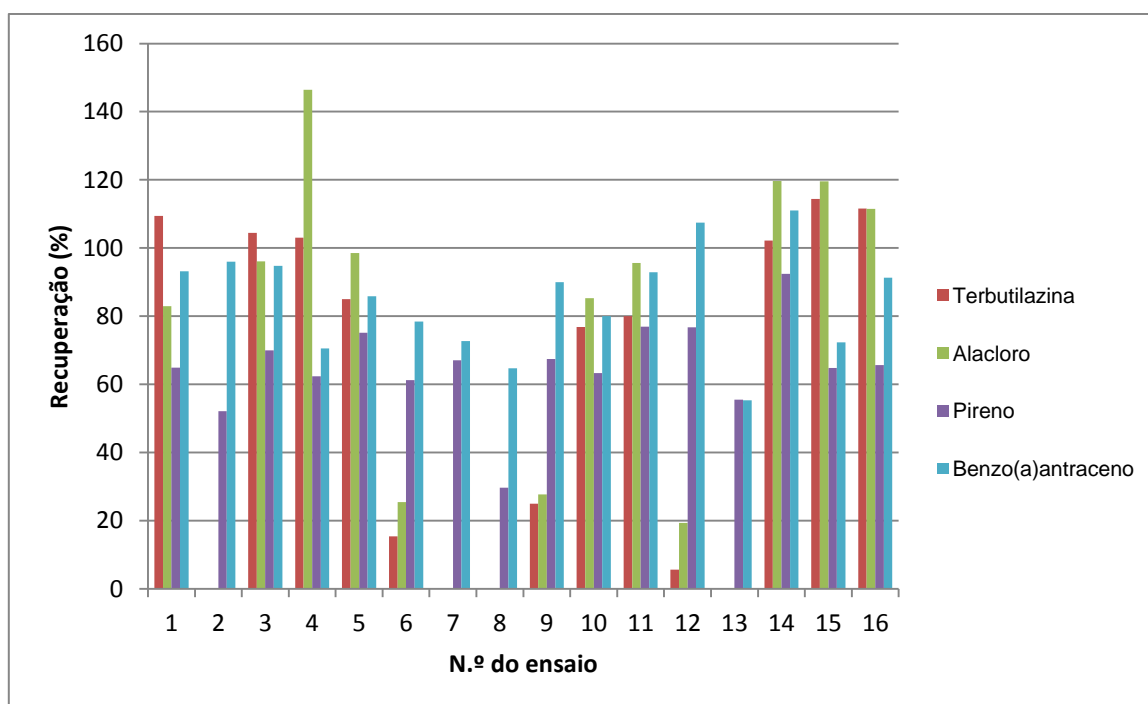


Figura 4.3 - Resultados da recuperação (%) dos ensaios realizados na validação da metodologia SPE

Pela análise da representação gráfica (Figura 4.3), o ensaio com recuperação mais aproximada dos 100% para os quatro compostos foi o ensaio n.º 14 (valores no Anexo B). Procedeu-se então ao estudo da recuperação em matrizes aquosas com volumes superiores nas mesmas condições descritas no ensaio n.º 14. Foram estudados os seguintes volumes: 1000 mL (ensaio 17), 2000 mL (ensaio 18), 3000 mL (ensaio 19) e 5000 mL (ensaio 20) (Figura 4.4).

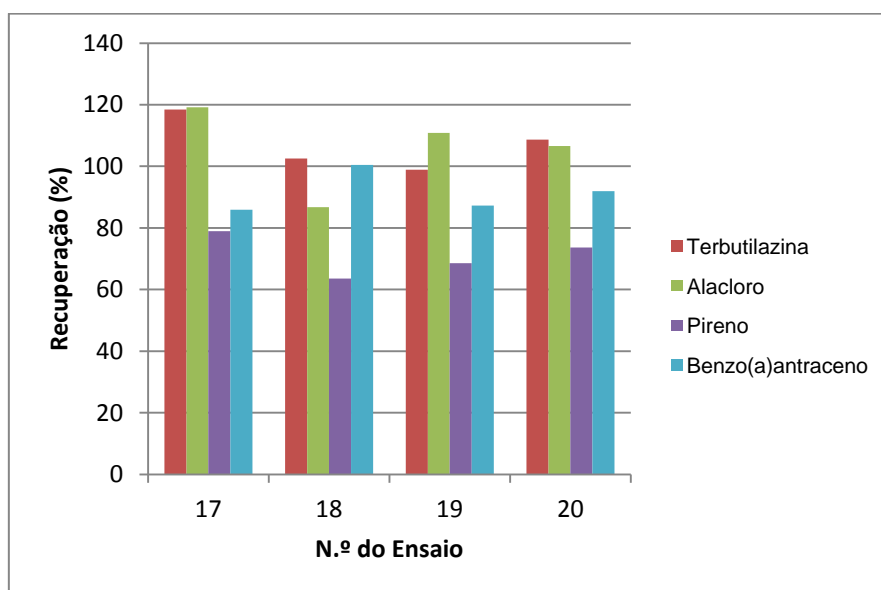


Figura 4.4 - Resultados da recuperação (%) dos ensaios realizados para validação da metodologia SPE no estudo dos volumes

Não se verificou um decréscimo na recuperação com o aumento do volume das amostras de água fortificada (Figura 4.4). Assim, o ensaio de 5000 mL foi repetido para obtenção do valor em triplicado (Tabela 4.4) (valores no Anexo C).

Tabela 4.4 - Recuperação média (%) do ensaio n.º 20 para validação do método SPE-GC-MS em matrizes aquosas fortificadas

	Recuperação média (%)
Terbutilazina	105,75
Alacloro	102,37
Pireno	67,83
Benzo(a)antraceno	85,53

A terbutilazina, o alacloro e o benzo(a)antraceno tiveram recuperações médias entre 75 e 125%. O pireno teve uma recuperação média entre 65 e 70% (Tabela 4.4). Esta metodologia foi aplicada posteriormente na concentração das amostras de água reais.

4.3 Caracterização Físico-química das Amostras do Estuário do Sado

As amostras de água colhidas no Estuário do Sado foram submetidas à análise de alguns parâmetros químicos no Laboratório de Química das Águas, Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). As análises foram efetuadas tendo em conta os procedimentos em uso neste mesmo laboratório. Os resultados estão descritos na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Resultados da análise físico-química feita às amostras de água colhida no Estuário do Sado, com determinação dos parâmetros condutividade, pH, COT e cloretos

Identificação da Amostra	Condutividade (mS.cm ⁻¹)	pH	COT (mg.L ⁻¹)	Cloretos (10 ³ mg.L ⁻¹)
A1	46,1	8,001	44,65	21,7
A2	45,8	8,053	46,20	20,1
A3	46,0	8,020	48,50	20,6
A4	45,7	8,027	47,55	20,7
A5	46,0	7,989	57,25	20,6
A6	46,0	8,014	48,60	20,9

*COT – Compostos Orgânicos Totais

Estes resultados demonstram que existe um grande paralelismo na sua mineralização, avaliada pelos valores da condutividade elétrica, e teor de matéria orgânica, avaliada pelo valor do COT. Os valores de COT podem ser considerados relativamente elevados.

4.4 Implementação e Validação do Teste de Ames

4.4.1 Confirmação das Características Genéticas das Estirpes

As cinco colónias da estirpe de *Salmonella typhimurium* TA100 selecionadas para a confirmação do fenótipo apresentaram as características pretendidas. Verificou-se crescimento celular na placa VB suplementada com L-histidina, D-biotina e ampicilina bem como na placa MacConkey e inibição do crescimento nas placas VB, uma suplementada com D-biotina e a outra com L-histidina.

O ensaio realizado com as colónias da estirpe TA98 demonstrou que apenas uma das selecionadas apresentava as características fenotípicas pretendidas, uma vez que as restantes apresentaram crescimento celular na placa VB suplementada com D-biotina (his⁻).

Os resultados obtidos no teste preliminar de mutagénesse (tratamento com 2NF para a TA98 e NaN₃ para a TA100) estão representados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Resultados obtidos no teste de mutagénesse realizado com o candidato da TA98 e com os cinco candidatos da TA100

Estirpe e candidato em estudo	Média do n° de revertentes/ placa (sem mutagénico)	Média do n° de revertentes/ placa (com mutagénico)	N.º de colónias induzidas
TA98 (5)	11	287	276
TA100 (1)	193	803	610
TA100 (2)	208	751	544
TA100 (3)	199	869	670
TA100 (4)	198	789	592
TA100 (5)	234	876	643

O candidato da TA98 demonstrou indução de colónias na presença do mutagénico assim como todos os candidatos da TA100, pelo que se encontram em condições de serem utilizados nos estudos futuros de mutagenicidade. O candidato escolhido da TA100 foi o n.º 5 devido ao elevado número de colónias induzidas. Apesar do número de colónias induzidas ser superior no candidato 3, este apresentou um número muito elevado de revertentes espontâneos numa das placas, pelo que se teve de desprezar esse valor.

4.4.2. Curvas dose/resposta para agentes reconhecidamente mutagénicos

Os resultados dos ensaios para obtenção das curvas dose-resposta relativas à indução de mutações pelos compostos utilizados como controlo positivo (2NF, DMBA e NaN_3) estão representados na Figura 4.5.

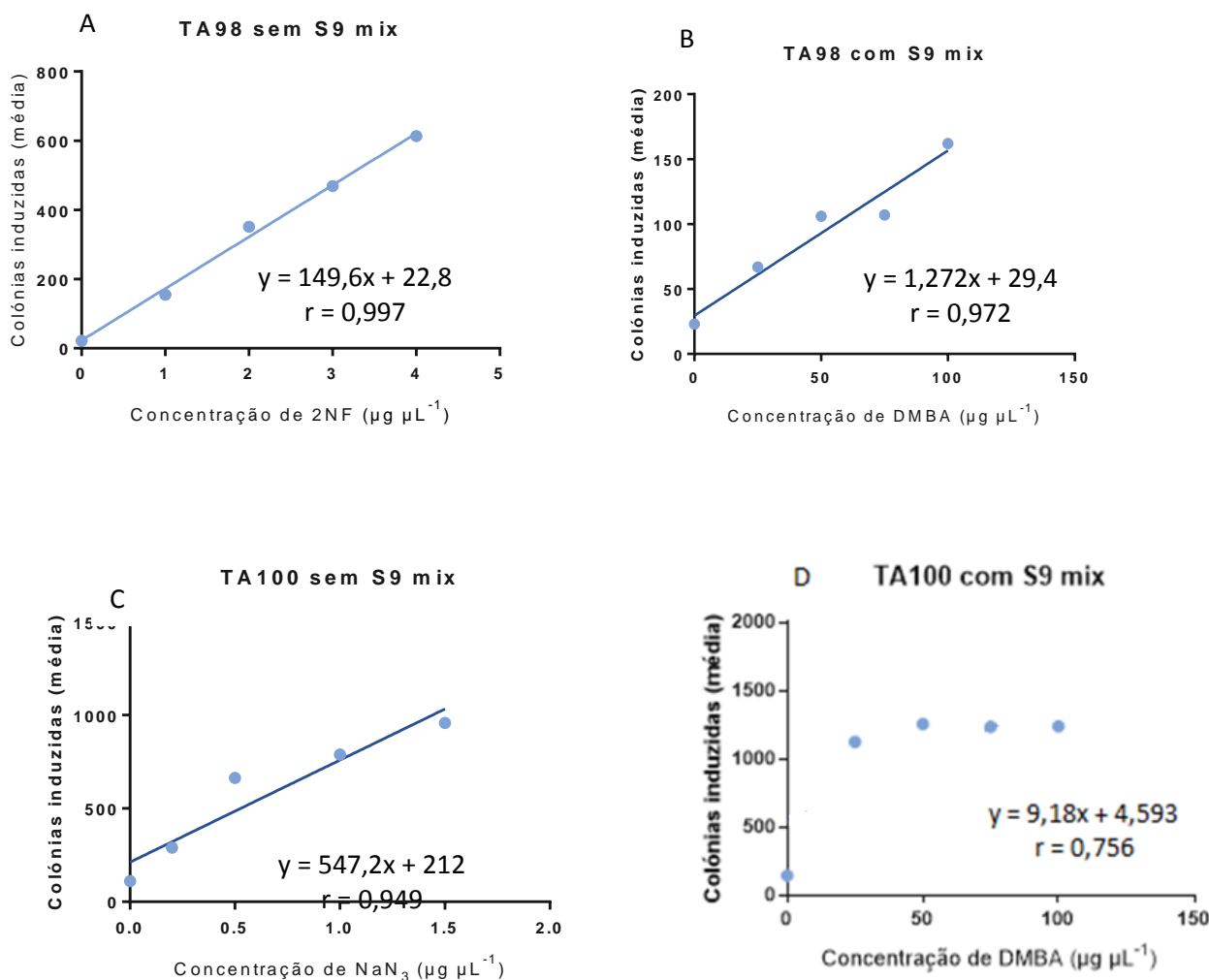


Figura 4.5 - Representação gráfica dos resultados do Teste de Ames para obtenção das curvas dose resposta das estirpes TA98 e TA100, sem e com ativação metabólica e respetivas retas de regressão linear: A – N.º de colónias induzidas da TA98 sem S9 no teste de mutagénese com 2NF; B - N.º de colónias induzidas da TA98 com S9 no teste de mutagénese com DMBA; C - N.º de colónias induzidas da TA100 sem S9 no teste de mutagénese com NaN_3 ; D - N.º de colónias induzidas da TA100 com S9 no teste de mutagénese com DMBA

De uma forma geral, após a análise de regressão encontrou-se uma relação linear entre a concentração do mutagénico e o número de colónias produzidas exceto para o tratamento da estirpe TA100 com DBMA e ativação metabólica (Figura 4.5). Neste último caso, parece ter-se atingido uma saturação relativamente ao número de colónias revertentes induzidas por concentrações de DMBA superiores a $25 \mu\text{g.L}^{-1}$.

4.4.3. Aplicação do teste de Ames para deteção do potencial mutagénico de amostras de água do Estuário do Sado

Os resultados da aplicação do Teste de Ames às amostras de água (após a sua concentração) colhidas no Estuário do rio Sado e à amostra fortificada estão representados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Resultados do teste de Ames - mutagenicidade das amostras de água após a sua concentração (amostras do estuário: A1 a A6; água fortificada: F1)

Amostra	C ($\mu\text{L}/\text{placa}$)	Nº de colónias revertentes/ placa (Média \pm DP)			
		TA98 (– S9)	TA98 (+ S9)	TA100 (– S9)	TA100 (+ S9)
Controlo -	0	29,33 \pm 2,49	33,50 \pm 2,50	285,67 \pm 14,64	232,00 \pm 0,00*
Controlo +	(Ponto 3 da curva)	295,00 \pm 91,45	102,50 \pm 1,50	**	848,50 \pm 17,50
A1	10	33,33 \pm 3,30	37,50 \pm 3,50	242,00 \pm 16,31	249,00 \pm 0,00*
	20	30,33 \pm 1,25	41,00 \pm 0,00*	219,00 \pm 2,16	216,00 \pm 0,00*
	40	24,33 \pm 4,19	39,50 \pm 1,50	234,67 \pm 7,36	217,00 \pm 5,00
A2	10	23,67 \pm 3,86	40,50 \pm 1,50	248,33 \pm 17,56	243,00 \pm 2,00
	20	23,00 \pm 4,97	36,00 \pm 4,00	223,00 \pm 6,38	240,00 \pm 22,00
	40	20,33 \pm 1,70	37,00 \pm 0,00*	234,67 \pm 19,60	230,00 \pm 1,00
A3	10	25,33 \pm 4,92	38,00 \pm 2,00	257,67 \pm 10,78	228,00 \pm 2,00
	20	31,67 \pm 2,36	35,00 \pm 6,00	234,00 \pm 13,74	249,00 \pm 0,00*
	40	23,00 \pm 3,56	40,50 \pm 1,50	262,00 \pm 7,79	241,00 \pm 7,00
A4	10	33,00 \pm 3,74	28,00 \pm 3,00	270,33 \pm 25,72	211,50 \pm 15,50
	20	28,33 \pm 4,11	37,00 \pm 3,00	248,33 \pm 6,02	231,00 \pm 10,00
	40	30,33 \pm 3,09	39,50 \pm 0,50	241,33 \pm 7,13	232,00 \pm 7,00
A5	10	29,33 \pm 4,03	38,50 \pm 1,50	246,00 \pm 15,12	246,50 \pm 0,50
	20	31,00 \pm 3,74	32,50 \pm 1,50	247,00 \pm 4,97	231,00 \pm 0,00*
	40	35,67 \pm 3,30	36,00 \pm 1,00	233,67 \pm 13,77	221,50 \pm 3,50
A6	10	31,33 \pm 2,05	46,00 \pm 2,00	246,33 \pm 4,78	228,00 \pm 1,00
	20	24,33 \pm 3,40	38,00 \pm 0,00*	224,67 \pm 14,64	229,00 \pm 5,00
	40	29,67 \pm 7,04	31,00 \pm 1,00	241,67 \pm 9,03	234,50 \pm 8,50
F1	1	34,33 \pm 5,91	35,50 \pm 1,50	237,00 \pm 13,00	243,50 \pm 4,50
	5	28,00 \pm 4,55	42,00 \pm 9,00	231,67 \pm 5,56	233,00 \pm 8,00
	10	24,67 \pm 4,64	36,00 \pm 3,00	243,33 \pm 9,74	241,00 \pm 7,00
	20	28,00 \pm 3,27	30,00 \pm 4,00	249,00 \pm 7,48	228,50 \pm 13,50
	40	33,33 \pm 3,30	37,00 \pm 1,00	246,00 \pm 4,97	206,00 \pm 16,00

*Resultado de um ensaio; ** Não foi possível proceder à contagem devido ao número de revertentes demasiado elevado

Segundo os critérios definidos por Mortelmans e Zeiger (2000) (23), os resultados obtidos podem ser considerados negativos, uma vez que não se observa nenhum aumento no número de colónias revertentes relacionado com a dose.

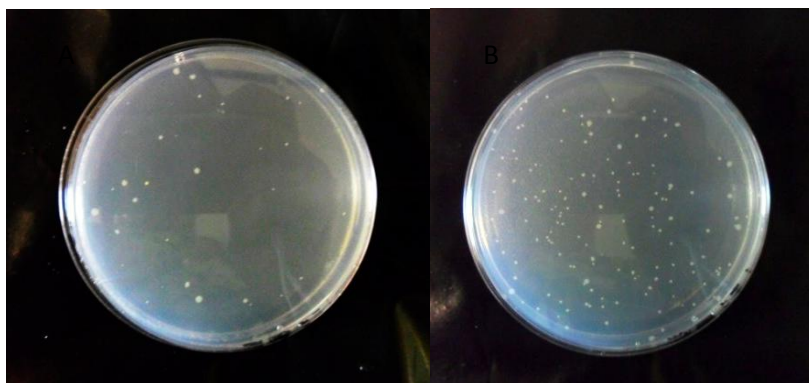


Figura 4.6 – Aspeto macroscópico das placas do controlo negativo, sem adição de mutagénico (A), e controlo positivo, com adição de 2NF (B), no ensaio sem ativação metabólica da TA98

Os controlos positivos induziram um claro aumento do número de colónias revertentes (Tabela 4.7) relativamente ao número de colónias obtidas para os controlos negativos (Figura 4.6).

O facto de se terem obtido resultados negativos para todas as amostras testadas inviabilizou qualquer análise de correlação entre o potencial mutagénico das amostras de água e o valor dos parâmetros físico-químicos determinados nas mesmas amostras.

5. Discussão

Sendo a água essencial à vida, a poluição da mesma constitui um problema ambiental grave que pode ter consequências para a saúde humana (1-2). No caso das águas superficiais o problema é ainda mais grave devido à formação de misturas complexas de tóxicos de difícil detecção (2). Assim, para além da comum análise química para identificar a presença de compostos químicos ou elementos com o potencial de causarem efeitos tóxicos no homem e no ecossistema, têm sido também utilizados para esse fim ensaios de genotoxicidade de curto-termo, como por exemplo, o Teste de Ames (4; 23; 32-33).

No caso do Estuário do Sado, realizaram-se previamente diversos estudos para avaliar o potencial genotóxico dos contaminantes presentes em amostras de sedimentos colhidas em vários pontos do estuário (8; 16-18; 20). A escassez de estudos relativamente à caracterização da atividade mutagénica da água desse estuário aliada às vantagens do teste de Ames, tais como simplicidade, relação custo-eficácia, flexibilidade e existência de um grande banco de dados validados, justificaram a realização deste estudo (29).

Verificou-se que as seis amostras de água colhidas em vários pontos do estuário apresentaram resultados negativos quanto ao potencial mutagénico, avaliado através do teste de Ames. Para além disso, a amostra fortificada revelou também um resultado negativo. Há que assinalar, no entanto, que os compostos químicos utilizados como controlos positivos (DMBA para ambas as estirpes com ativação metabólica, 2NF para TA98 sem ativação metabólica e NaN_3 para TA100 sem ativação metabólica) originaram um aumento do número de colónias revertentes dependente da dose, tal como esperado, provando assim que o teste estava a funcionar. Segundo os resultados analíticos do estudo de Carreira *et al.* (2013), relativamente às concentrações de metais, HAPs e pesticidas nos sedimentos do estuário, verificou-se que em algumas amostras, especialmente da área Norte, existiam concentrações elevadas de metais e HAPs (60). Por outro lado, estudos anteriores cujo objetivo era determinar a genotoxicidade dos sedimentos do Estuário do Sado, observaram efeitos genotóxicos, nomeadamente danos oxidativos no ADN e indução de micronúcleos numa linha celular humana. Estes resultados vão ao encontro das concentrações de poluentes observadas, tais como, pesticidas, HAPs e metais (17-18; 60). Assim, seria expectável a existência de resultados positivos neste estudo. Contudo, segundo Ohe *et al.* (2004), de entre os estudos analisados para verificar o potencial mutagénico das águas naturais, nomeadamente de rios, apenas cerca de 15% obtiveram resultados positivos no teste de Ames com utilização da estirpe TA98 e 7% com a estirpe TA100, com e sem ativação metabólica. A Europa foi, porém, um dos continentes cujos rios demonstraram estar especialmente afetados por compostos mutagénicos (4).

Ainda relativamente aos resultados anteriores obtidos para os extratos de amostras de sedimentos, há que ter em conta que a concentração de tóxicos em sedimentos é diferente da existente na água, uma vez que os compostos, principalmente metais, se acumulam nos mesmos (4; 5; 7). No entanto, a utilização dos sedimentos neste estudo em vez da água poderia não trazer vantagens, uma vez que se sabe que o teste de Ames não é o teste mais sensível para avaliar o potencial mutagénico de metais (61). Para além disso, a maior importância do estudo da água em comparação com os sedimentos assenta no facto das elevadas concentrações de poluentes nos sedimentos não estarem biodisponíveis. O estudo da água é, assim, mais representativo do risco para os seres humanos e para ambiente (5).

Os testes utilizados e os parâmetros analisados para avaliar a genotoxicidade dos contaminantes estuarinos nos dois tipos de amostras também foram distintos. Assim, sabe-se que se podem verificar

efeitos genotóxicos, por exemplo através do ensaio do micronúcleo, e não existirem resultados positivos no teste de Ames para a mesma amostra (40). Isto é possível, uma vez que o ensaio do micronúcleo deteta danos ao nível do cromossoma, enquanto o teste de Ames deteta mutações do tipo *frameshift* ou por substituição dos pares de base. Também não existe um método único que seja capaz de detetar de forma adequada todos os tipos de alterações genéticas que podem ser induzidos por todas as classes de compostos genotóxicos e / ou misturas químicas complexas (32).

O volume de amostra de água utilizado no presente estudo foi de 5000 mL, tendo como base o estudo de Aleem e Malik (2005) (47). Estes investigadores demonstraram existir resultados positivos para amostras de água do Rio Yamuna, utilizando 5000 mL de água concentrada (fator de concentração de 5000x). Ainda assim, há que ter em conta a elevada carga poluente desse rio, que recebe grandes volumes de efluentes domésticos e industriais (47). Analisando, contudo, os dados da Tabela 1.2, relativos a estudos para avaliação do potencial mutagénico de águas superficiais, pode-se verificar que a maioria utiliza volumes superiores (34; 36; 38; 47-50; 52). O fator de concentração de 5000x nas amostras de água do Estuário do Sado também foi definido com base no estudo de Aleem e Malik (2005) (47). O estudo de Siddiqui e Ahmad (2003) utiliza, no entanto, um fator de concentração inferior, isto é, de 300x (37). Para além disso, a EPA define que o fator de concentração deve ser igual ou superior a 200. Assim, considerou-se que o fator de concentração de 5000x era adequado para o ensaio realizado (42).

Vários estudos incluem colheitas de amostras de água em épocas distintas do ano, por exemplo, primavera, verão, outono ou apenas primavera e outono (33; 36; 39; 41; 47). Para este estudo foi escolhida a época representativa do pior cenário admitido, uma vez que as amostras da primavera tendem a ser menos tóxicas que as do outono, provavelmente porque os contaminantes se encontram mais diluídos com as águas da chuva (41).

Também o armazenamento das amostras de água pode ter influenciado os resultados obtidos, uma vez que o armazenamento por longos períodos a 0°C pode alterar as características dos compostos. Assim, as amostras deveriam ter sido concentradas num curto espaço de tempo após a colheita ou, alternativamente, ser armazenadas a temperatura igual ou inferior a -40°C (44).

Para além disso, o método de concentração das amostras de água pode ter influenciado os resultados obtidos. Devido à grande variedade de compostos químicos existentes na água, naturalmente ou como contaminantes, dificilmente se poderá encontrar um método único capaz de concentrar todos os constituintes orgânicos presentes numa amostra de água. Por outro lado, existem muitos fatores a ter em conta na escolha do método: a natureza dos componentes de interesse, o volume da amostra de água, métodos de ensaio analíticos ou toxicidade que irão ser utilizados, o tipo de concentrado desejado, a pureza necessária de concentrado, e a estabilidade do concentrado ou constituintes isolados durante o armazenamento (43).

Para a concentração das amostras, a escolha do material adsorvente teve como base as interações existentes entre os analitos a extrair (compostos orgânicos) e o meio aquoso, extremamente polar. Nesta situação, o método SPE classifica-se de fase reversa (55). Como a maioria dos compostos orgânicos tem uma estrutura que permite a adsorção em materiais apolares ligando-se por ação de forças de Van-der-Waals, o material utilizado foi uma sílica modificada octadecil, conhecida por C18 (54-55). Uma das vantagens das colunas C18 para este estudo é o facto de serem pouco seletivas, uma vez que os grupos funcionais interagem com quase todos os compostos apolares (54), permitindo a extração de uma maior variedade de compostos mutagénicos. Outra das vantagens da sílica modificada é ser estável num intervalo de pH entre 1 e 8,5 (46). A alteração do pH para valores mais baixos fez

com que fosse favorecida a extração de compostos orgânicos ácidos em detrimento dos compostos orgânicos básicos, extraídos mais facilmente a pH mais elevado (43). Assim, apesar de resultados com boa recuperação nas amostras fortificadas a pH 2, as amostras deveriam ter sido ajustadas também a pH 7, tal como aconteceu no estudo de Leusch *et al.* (2012) (62).

Sabe-se, de uma forma geral, que os compostos apolares, adsorvidos a um material apolar, são também eluídos com um solvente apolar (54; 56; 58). A utilização de dois solventes de eluição, com polaridade diferente, teve como objetivo a eluição de compostos orgânicos com características distintas. Assim, utilizou-se o metanol, um composto polar, e o diclorometano, apolar (55; 58). O metanol é único na sua interação com ambos os grupos apolares e polares (58). Se um solvente apolar não eluir eficientemente um composto, pode ser necessária a adição de um solvente mais polar, como o metanol, para romper quaisquer interações polares que retêm o composto. Nestes casos, o metanol rompe as ligações de hidrogénio existentes com os grupos hidroxilo na superfície da sílica (56). Por outro lado, a adição de solventes orgânicos miscíveis em água, como o acetonitrilo adicionado neste método, reduz a tensão superficial da matriz, diminuindo assim a capacidade de retenção de compostos altamente hidrofóbicos (56). Assim, os métodos com melhor recuperação para os HAPs foram aqueles em que se adicionou o acetonitrilo.

O método de concentração desenvolvido e validado incluiu apenas quatro compostos: dois pesticidas e dois HAPs. A escolha destes compostos baseou-se na disponibilidade dos recursos técnicos do laboratório, tempo para a validação do método e por fazerem parte dos grupos identificados como poluentes nos sedimentos do Estuário do Sado (17-18). O estudo de Leusch *et al.* (2012) difere do presente já que utilizou uma grande quantidade de pesticidas, compostos farmacêuticos, hormonas e compostos industriais para otimizar um método de extração de micropoluentes em amostras de água (62). Contudo, o objetivo principal deste trabalho não era a otimização do método de extração, embora a recuperação dos contaminantes aquáticos seja um passo determinante para o sucesso da determinação do potencial mutagénico das amostras de água.

Relativamente à aplicação do teste de Ames, a maioria dos autores defende que se devem utilizar múltiplas estirpes para avaliação da mutagenicidade de amostras complexas, uma vez que a utilização apenas de uma pode não ser suficiente para detetar o potencial mutagénico da variedade de agentes presentes em amostras de água (37). Neste estudo, foram escolhidas as estirpes de *Salmonella typhimurium* TA98 e a TA100 que são complementares, na medida em que permitem a caracterização de diferentes tipos de mutações. Estas estirpes têm sido as mais utilizadas para avaliar o potencial mutagénico de águas superficiais (4). Devido ao limite de recursos técnicos e de tempo, apenas foi possível a utilização de três concentrações diferentes de cada amostra de água do estuário sendo que, esse facto poderia condicionar o traçado da curva dose-efeito, caso houvesse amostras com resultados positivos. Também os ensaios com ativação metabólica, isto é, com adição do S9 mix, foram feitos apenas em duplicado. Devido à poupança de recursos não foi viável fazer em triplicado como nos ensaios sem ativação metabólica. Apesar de ser mais difícil a interpretação de resultados, Maron e Ames (1983) indicam que cada ensaio deve ser feito em duplicado (27) e, portanto, esta alternativa não deverá ter influenciado os resultados obtidos. Em ensaios futuros aconselha-se o estudo de uma maior gama de concentrações e, se possível, em triplicado.

Outra das questões que se coloca é a utilização do teste de Ames em amostras de água salgada. Segundo Czyz *et al.* (2002) a sua utilização pode ser problemática. Alternativamente, estes autores utilizaram estirpes modificadas de *Vibrio harveyi*., bactéria que pode ser encontrada em diversos ambientes marinhos. Os seus estudos demonstraram que este microrganismo é mais sensível aos agentes mutagénicos existentes em amostras aquosas marinhas do que *Salmonella typhimurium* (63).

Ainda assim, é possível obter resultados positivos no Teste de Ames em amostras de água salgada (64). Para além disso, as águas estuarinas apresentam níveis de salinidade mais baixos.

Relativamente aos resultados da análise química efetuada às amostras de água do Rio Sado, conclui-se que existe um grande paralelismo na sua mineralização, avaliada pelos valores da condutividade elétrica, e no teor de matéria orgânica, avaliada pelo valor do COT. Os teores de matéria orgânica consideram-se relevantes embora, a avaliar pela negatividade dos Testes de Ames efetuados, não pareçam incluir substâncias mutagénicas em concentrações de risco para a saúde humana e o ambiente. Os resultados dos estudos para avaliar a genotoxicidade das águas são considerados de difícil interpretação (71). Relativamente aos resultados negativos obtidos para as várias amostras de água do estuário do Sado, conhecendo os valores (relativamente elevados) de COT dessas amostras e considerando o potencial genotóxico dos sedimentos estuarinos torna-se difícil explicar estes resultados que indicam que as seis amostras de água do Estuário do Sado não têm compostos considerados mutagénicos. Demonstrou-se já que são muitas as variáveis que poderão ter afetado o resultado do teste de Ames, nomeadamente as relacionadas com o método de concentração das amostras, como já foi discutido acima.

A utilização alternativa do teste de flutuação de Ames em detrimento do teste de incorporação em placa para avaliar a genotoxicidade de águas, como alguns autores advogam, não parece ter vantagens significativas. Siddiqui e Ahmad (2003) num estudo para comparar a sensibilidade dos dois testes em água residual industrial, água subterrânea e água de rio, verificaram que ambos são eficazes (37).

A amostra de água fortificada com a solução de concentração intermédia da mistura dos dois pesticidas e dos dois HAPs ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$), também deu um resultado negativo no Teste de Ames, ao contrário do que era esperado. A concentração dos compostos adicionados foi definida com base nos valores paramétricos da legislação da água destinada ao consumo humano (Decreto-Lei n.º 306/2007) que indica na parte II do anexo I como valor paramétrico para cada pesticida individual e para HAP totais $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (60). Assim, pode-se concluir que uma amostra de água com terbutilazina, alacloro, pireno e benzo(a)antraceno no limite da concentração máxima definida pela legislação para água para consumo humano não apresenta potencial mutagénico detetável pelas estirpes TA98 e TA100.

No que se refere à mutagenicidade de cada um dos compostos utilizados na fortificação da água, em estudos anteriores, a terbutilazina originou resultados negativos no Teste de Ames, com e sem ativação metabólica, até ao seu limite de solubilidade (5 mg.mL^{-1}) (67). Também o alacloro apresentou resultados negativos para cinco estirpes de *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA100, TA1537, TA1538, e TA98) em concentrações entre 10 e 5000 $\mu\text{g/ placa}$ com e sem ativação metabólica (68). De acordo com a literatura existente sobre a carcinogenicidade destes compostos, a terbutilazina foi incluída no grupo D - não classificado como agente carcinogénico humano e o alacloro como susceptível de ser cancerígeno para humanos em doses elevadas e provavelmente não cancerígeno em doses baixas (65). Contudo, no caso dos HAPs era de esperar que fosse encontrada mutagenicidade, principalmente nos ensaios com ativação metabólica (12; 14; 23), dado que estes compostos são, de uma forma geral, biologicamente inativos a menos que sejam metabolizados para formas ativas. Para tal, no teste de Ames é utilizado um sistema exógeno de metabolização preparado a partir de fígado de rato, o S9 mix, que contém o sistema citocromo P450. Este é capaz de metabolizar os compostos através de reações de fase I no sentido da formação de metabolitos mais eletrofílicos (por exemplo, epóxidos) que são altamente reativos face à molécula de ADN, formando aductos e dando origem a mutações (23). Vários estudos têm sugerido que o pireno e seus derivados possuem potencial mutagénico, em ensaios com várias estirpes de *Salmonella typhimurium* (69). O benzo(a)antraceno também demonstrou ter potencial mutagénico em testes com a estirpe TA100 numa concentração de

10 µg/ placa (70), concentração essa que era superior às concentrações testadas no presente estudo. Segundo a classificação da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) , o pireno consta do grupo 3 – não classificado como cancerígeno para humanos mas o benzo(a)antraceno está inserido no grupo 2B – possivelmente cancerígeno para humanos (66). Tendo em conta que existe uma elevada correlação entre o potencial mutagénico de substâncias químicas detetado pelo Teste de Ames e a carcinogenicidade das mesmas (30-31) seria expetável que, pelo menos, a presença de benzo(a)antraceno na mistura conduzisse a um resultado positivo. Porém, para além de se terem utilizado concentrações baixas dos compostos, não é de excluir a possibilidade de ter ocorrido uma interação entre os compostos da mistura no sentido de um efeito antagonístico.

Este estudo constituiu uma primeira abordagem a esta problemática. O método de concentração desenvolvido poderá ser otimizado para um maior número de compostos tóxicos, tais como, outros pesticidas e HAPs. Por outro lado, a utilização de um volume maior de água e o ajuste do pH também para 7 podem ser outros fatores a considerar em estudos posteriores.

6. Conclusão e Considerações Finais

Neste estudo, com o método de concentração utilizado, verificou-se que as seis amostras de água e a amostra fortificada revelaram resultados negativos quanto ao potencial mutagénico analisado pelo Teste de Ames.

A utilização deste teste para avaliar a toxicidade de uma água superficial, nomeadamente a do Estuário do Sado, mostrou ser um grande desafio. Por um lado, a necessidade de grande volume de amostra e, por outro, a seleção de um método de concentração que retenha o máximo de compostos químicos existentes na água, implica o dispêndio de muitos recursos laboratoriais, uma vez que existem muitos fatores a ter em conta na sua escolha. Para além disso, é difícil encontrar um método que seja capaz de concentrar todos os constituintes orgânicos da matriz aquosa. A falta de uniformização de métodos de concentração pode pois constituir uma falha na otimização de resultados e comparação dos mesmos. Assim, a aposta poderá ser no desenvolvimento de métodos padronizados de concentração de amostras de água.

Por outro lado, o teste de Ames tem as suas limitações, podendo não ser o teste mais adequado para utilizar, por exemplo, em amostras de água salgada. Como é sabido, não permite a caracterização de outro tipo de alterações genéticas, ao nível da clastogenicidade ou aneugenicidade. Assim, em paralelo com o teste de Ames, seria importante em estudos futuros a análise de extratos de sedimentos do estuário e a implementação de outros ensaios de genotoxicidade para avaliar a genotoxicidade das águas.

Contudo, é indiscutível que a utilização do Teste de Ames no estudo do potencial mutagénico de águas superficiais é vantajoso comparativamente ao uso de outros ensaios de genotoxicidade, atendendo à sua rapidez, facilidade de execução e baixo custo e uma vez que não é necessária a identificação dos compostos existentes na mesma.

7. Referências Bibliográficas

- (1) World Health Organization (2016) Water, health and ecosystems. Consultado a 10 de setembro de 2016 em <http://www.who.int/heli/risks/water/water/en/>
- (2) Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., von Gunten, U. and Wehrli, B. (2006) The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science.*, **313**, 1072-1077
- (3) Kjellstrom, T., Lodh, M., McMichael, T., Ranmuthugala, G., Shrestha, R. and Kingsland, S. (2006) Air and Water Pollution: Burden and Strategies for Control. In Jamison, D. T., Breman, J. G., Measham, A. R., Alleyne, G., Claeson, M., Evans, D. B., Jha, P., Mills, A. and Musgrove, P. (eds), *Disease Control Priorities in Developing Countries*. World Bank, Washington (DC), chapter 43
- (4) Ohe, T., Watanabe, T. and Wakabayashi, K. (2004) Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res.*, **567**, 109-149
- (5) Parrella, A., Lavorgna, M., Criscuolo, E. and Isidori, M. (2013) Mutagenicity, Genotoxicity, and Estrogenic Activity of River Porewaters. *Arch Environ Contam Toxicol.*, **65**, 407-420
- (6) Sem autor. (1972) Pollution in Estuaries. *Br Med J.*, **4**, 382
- (7) Vargas, V. M., Migliavacca, S. B., de Melo, A. C., Horn, R. C., Guidobono, R. R., de Sá Ferreira, I. C. and Pestana, M. H. (2001) Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat Res.*, **490**, 141-158
- (8) Costa, P. M., Caeiro, S., Vale, C., DelValls, T. À. And Costa, M. H. (2012) Can the integration of multiple biomarkers and sediment geochemistry aid solving the complexity of sediment risk assessment? A case study with a benthic fish. *Environ. Pollut.*, **161**, 107-120.
- (9) Vincent-Hubert, F., Heas-Moisán, K., Munschy, C. and Tronczynski, J. (2012) Mutagenicity and genotoxicity of suspended particulate matter in the Seine river Estuary. *Mutat Res.*, **741**, 7-12
- (10) Thomas, K. V., Balaam, J., Barnard, N., Dyer, R., Jones, C., Lavender, J. and McHugh, M. (2002) Characterisation of potentially genotoxic compounds in sediments collected from United Kingdom estuaries. *Chemosphere.*, **49**, 247-258
- (11) Luo, X., Mai, B., Yang, Q., Fu, J., Sheng, G. and Wang, Z. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides in water columns from the Pearl River and the Macao harbor in the Pearl River Delta in South China. *Mar Pollut Bull.*, **48**, 1102-1115
- (12) Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M. H., Pottier, D. and Budzinski, H. (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol.*, **79**, 257-267
- (13) Costa, P. M., Lobo, J., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., Delvalls, T. A. and Costa, M. H. (2008) Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. *Mutat Res.*, **654**, 29-37
- (14) Liu, L., Chen, L., Floehr, T., Xiao, H., Bluhm, K., Hollert, H. and Wu, L. (2015) Assessment of the Mutagenicity of Sediments from Yangtze River Estuary Using Salmonella Typhimurium/Microsome Assay. *PLoS One.*, **10**, e0143522
- (15) Long, A. S., Lemieux, C. L., Arlt, V. M. and White, P. A. (2016) Tissue-specific in vivo genetic toxicity of nine polycyclic aromatic hydrocarbons assessed using the MutaTMMouse transgenic rodent assay. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **290**, 31-42

- (16) Caeiro, S., Costa, M. H., Ramos, T. B., Fernandes, F., Silveira, N., Coimbra, A., Medeiros, G. and Painho, M. (2005) Assessing heavy metal contamination in Sado Estuary sediment: An index analysis approach. *Ecol. Indic.*, **5**, 151-169
- (17) Costa, P. M., Pinto, M., Vicente, A. M., Gonçalves, C., Rodrigo, A. P., Louro, H., Costa, M. H., Caeiro, S. and Silva, M. J. (2014) An integrative assessment to determine the genotoxic hazard of estuarine sediments: combining cell and whole-organism responses. *Front. Genet.*, **5**, 1-12
- (18) Pinto, M., Costa, P. M., Louro, H., Costa, M. H., Lavinha J., Caeiro, S. and Silva, M. J. (2014) Avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de contaminantes de sedimentos do Estuário do Sado numa linha celular humana. *INSA*, **4**, 18-21.
- (19) Lillebø, A. I., Coelho, P. J., Pato, P., Válega, M., Margalho R., Reis, M., Raposo, J., Pereira, E., Duarte, A. C. and Pardal, M. A. (2011) Assessment of Mercury in Water, Sediments and Biota of a Southern European Estuary (Sado Estuary, Portugal). *Water Air Soil Pollut.*, **214**, 667-680
- (20) Pinto, M. F., Louro, H., Costa, P. M., Caeiro, S. and Silva, M. J. (2015) Exploring the Potential Interference of Estuarine Sediment Contaminants with the DNA Repair Capacity of Human Hepatoma Cells. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **78**, 559-570
- (21) Costa, P. M., Neuparth, T. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., Angel Delvals, T. and Costa, M. H. (2010) Assessment of the genotoxic potential of contaminated estuarine sediments in fish peripheral blood: Laboratory versus in situ studies. *Environ. Res.*, **111**, 25-36
- (22) Carreira, S. (2011) Qualidade de bivalves estuarinos explorados para consumo: potencial risco para a espécie *Ruditapes decussatus*: um estudo de caso, (Master Thesis), Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, pp. 64
- (23) Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000) The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, **455**, 29-60
- (24) Czyz, A., Szpilewska, H., Dutkiewicz, R., Kowalska, W., Biniewska-Godlewska, A. and Wegrzyn, G. (2002) Comparison of the Ames test and a newly developed assay for detection of mutagenic pollution of marine environments. *Mutat Res.*, **519**, 67-74
- (25) Eastmond, D. A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W. A., Cimino, M. C., Dobrev, I., Douglas, G. R., Nohmi, T., Phillips, D. H. and Vickers, C. (2009) Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/ IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*, **24**, 341-349
- (26) Kirkland, D., Zeiger, E., Madia, F., Gooderham, N., Kasper, P., Lynch, A., Morita, T., Ouedraogo, G., Morte, J. M. P., Pfuhler, S., Rogiers, V., Schulz, M., Thybaud, V., Benthem, J., Vanparrys, P., Worth, A. and Corvi, R. (2014) Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. *Mutat. Res.*, **775-776**, 55-68
- (27) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **113**, 173-215
- (28) Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. and Lee, F. D. (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **70**, 2281-2285
- (29) Claxton, L. D., Umbuzeiro, G. A. and DeMarini, D. M. (2010) The *Salmonella* Mutagenicity Assay: The Stethoscope of Genetic Toxicology for the 21st Century. *Environ. Health Perspect.*, **118**, 1515-1522

- (30) McCann, J. and Ames, B. N. (1976) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 950-954
- (31) Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L. and Muller, L. (2005) Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutat. Res.*, **584**, 1-256
- (32) Trabez, S., Shakil, S., Urooj, M., Damanhour, G. A., Abuzenadah, A. M. and Ahmad, M. (2011) Genotoxicity Testing and Biomarker Studies on Surface Waters: An Overview of the Techniques and Their Efficacies. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, **29**, 250-275
- (33) Pellacani, C., Buschini, A., Furlini, M., Poli, P. and Rossi, C. (2006) A battery of in vivo and in vitro tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquat Toxicol.*, **77**, 1-10
- (34) Umbuzeiro G., A., Roubicek, D. A., Rech, C. M., Sato, M. I. and Claxton, L. D. (2004) Investigating the sources of the mutagenic activity found in a river using the *Salmonella* assay and different water extraction procedures. *Chemosphere.*, **54**, 1589-1597
- (35) Umbuzeiro, G. A., Roubicek, D. A., Sanchez, P. S. and Sato, M. I. (2001) The *Salmonella* mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. *Mutat Res.*, **491**, 119-126
- (36) Wu, J. Y. (2005) Assessing surface water quality of the Yangtze Estuary with genotoxicity data. *Mar Pollut Bull.*, **50**, 1661-1667
- (37) Siddiqui, A. H. and Ahmad, M. (2003) The *Salmonella* mutagenicity of industrial, surface and ground water samples of Aligarh region of India. *Mutat Res.*, **541**, 21-29
- (38) Filipic, M. (1995) Mutagenicity and toxicity of water extracts from the Sora river area. *Mutat Res.*, **342**, 1-8
- (39) Cerná, M., Pastorková, A., Smíd, J., Bavorová, H., Ocadlíková, D., Rössner, P. and Zavadil, J. (1996) Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and in vitro cytogenetic assay. *Toxicol Lett.*, **88**, 191-197
- (40) Gana, J. M., Ordóñez, R., Zampini, C., Hidalgo, M., Meoni, S. and Isla MI. (2008) Industrial effluents and surface waters genotoxicity and mutagenicity evaluation of a river of Tucuman, Argentina. *J Hazard Mater.*, **155**, 403-406
- (41) Filipic, M., Lovincic, D., Erjavec, M., Glavic, D. and Planina, P. (1995) Toxic and Genotoxic Activity of Water Samples from the River Ljubljana. *Bull Environ Contam Toxicol.*, **55**, 237-244
- (42) U. S. Environmental Protection Agency (1985). Guidelines for Preparing Environmental and Waste Samples for Mutagenicity (Ames) Testing: Interim Procedures and Panel Meeting Proceedings. Office of Research and Development, Las Vegas
- (43) Durand, A. M., Rottevel, S., Collombon, M. T., van der Grinten, E., Maas, J. L. and Verweij, W. (2009) Toxicity Measurements in Concentrated Water Samples. Evaluation and Validation. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM, BA Bilthoven
- (44) Jolley, R. L. and Suffet, I. H. (1987) Concentration Techniques for Isolating Organic Constituents in Environmental Water Samples. In Suffet, I. H. and Malaiyandi, M. (eds), *Organic Pollutants in Water*. American Chemical Society, pp. 3-14
- (45) Rawa-Adkonis, M., Wolska, L. and Namieśnik, J. (2010) Modern Techniques of Extraction of Organic Analytes from Environmental Matrices. *Cri Rev Anal Chem.*, **33**, 199-248
- (46) Wells, M. J. M. (2003) Principles of extraction and the extraction of semivolatile organic from liquids. In: Somenath, M. (eds) *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, pp. 37-131
- (47) Aleem, A. and Malik, A. (2005) Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. *Ecotoxicol Environ Saf.*, **61**, 404-412

- (48) Kummrow, F., Rech, C. M., Coimbra, C. A., Roubicek, D. A. and Umbuzeiro, A. (2003) Comparison of the mutagenic activity of XAD4 and blue rayon extracts of surface water and related drinking water samples. *Mutat Res.*, **541**, 103-113
- (49) Luo, X., Mai, B., Yang, Q., Fu, J., Sheng, G. and Wang, Z. (2004) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides in water columns from the Pearl River and the Macao harbor in the Pearl River Delta in South China. *Mar Pollut Bull.*, **48**, 1102-1115
- (50) Zani, C., Feretti D., Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., Guzzella, L., Caterino, F. D. and Monarca, S. (2005) Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. *Mutat Res.*, **587**, 26-37
- (51) Kwon, J. H., Lee, H. K., Kwon, J. W., Kim, K., Park, E., Kang, M. H. and Kim, Y. H. (2008) Mutagenic activity of river water from a river near textile industrial complex in Korea. *Environ Monit Assess.*, **142**, 289-296
- (52) Kanno, A., Nishi, I., Kishi, T., Kawakami, T., Takahashi, Y. and Onodera, S. (2010) Mutagenic potentials of Amberlite XAD-2-resin extracts obtained from river and drinking waters in the Northwest district of Chiba, Japan. *J Toxicol Sci.*, **35**, 817-826
- (53) Fontanals, N., Marcé, R., M. and Borrell, F. (2010) Overview of the novel sorbents available in solid-phase extraction to improve the capacity and selectivity of analytical determinations. *Contrib Sci.*, **6**, 199-213
- (54) Macherey-Nagel (s.d.) Solid Phase Extraction Application Guide. Decades of Experience and Innovation in Analytical Chemistry. Macherey-Nagel
- (55) Supelco. (1998) Guide to Solid Phase Extraction. Bulletin 910. Supelco
- (56) Wells, M. J. M. (2000) Essential Guides to method development in solid phase extraction. In Wilson, I. D., Adlard, E. R., Cooke, M. and Poole, C. F. (eds.) *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press, London, pp. 4636-4643
- (57) Żwir-Ferenc, A. and Biziuk, M. (2006) Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish J of Environ Stud.*, **15**, 677-690
- (58) RELACRE (2000). Validação de Métodos Internos de Ensaio. Guia RELACRE 13. RELACRE, Portugal
- (59) Decreto-Lei n.º 306/2007, de 27 de agosto
- (60) Carreira, S., Costa, P. M., Martins, M., Lobo, J., Costa, M. H. and Caeiro, S. (2013) Ecotoxicological Heterogeneity in Transitional Coastal Habitats Assessed Through the Integration of Biomarkers and Sediment-Contamination Profiles: A Case Study Using a Commercial Clam. *Arch Environ Contam Toxicol.*, **64**, 97-109
- (61) Codina, J. C., Pérez-Torrente, C., Pérez-García, A., Cazorla, F. M. and de Vicente, A. (1995) Comparison of microbial tests for the detection of heavy metal genotoxicity. *Arch Environ Contam Toxicol.*, **29**, 260-265
- (62) Leusch, F., D., L., Prochazka, E., Tan, B., L., L., Carswell, S., Neale, P. and Escher, B., I. (2012) Optimising micropollutants extraction for analyses of water samples: Comparison of Different Solid Phase Materials and Liquid-Liquid Extraction. In B. D., Kenway, S. J., Biermann, S. M. and Wakem, S. L. (ed.), Presented at the Science Forum and Stakeholder Engagement, Brisbane, Australia
- (63) Czyz, A., Szpilewska, H., Dutkiewicz, R., Kowalska, W., Biniewska-Godlewska, A. and Wegrzyn, G. (2002) Comparison of the Ames test and a newly developed assay for detection of mutagenic pollution of marine environments. *Mutat Res.*, **519**, 67-74
- (64) Zietz, B. P., Nordholt, G., Ketseridis, G. and Pfeiffer, E. H. (2001) Mutagenicity of Baltic SeaWater and the Relation to Certain Chemical and Microbiological Parameters. *Mar Pollut Bull.*, **42**, 845-851

- (65) U. S. Environmental Protection Agency (2015). Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Office of Pesticide Programs. Annual Cancer Report
- (66) International Agency for Research on Cancer. (s.d.) List of Classifications. Consultado a 13 de setembro de 2016 em http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php
- (67) U. S. Environmental Protection Agency (1994). Memorandum. Consultado a 13 de setembro de 2016 em https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-080814_13-Oct-94_016.pdf
- (68) U. S. Environmental Protection Agency (1998). Reregistration Eligibility Decision (RED): Alachlor. Consultado a 14 de setembro de 2016 em <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0063.pdf>
- (69) Hsu, K. H., Su, B. H., Tu, Y. S., Lin, O. A. and Tseng, Y. J.. (2016) Mutagenicity in a Molecule: Identification of Core Structural Features of Mutagenicity Using a Scaffold Analysis. *PLoS One*, **11**, e0148900
- (70) Coombs, M. M., Dixon, C. and Kissonerghis, A. M. (1976) Evaluation of the Mutagenicity of Compounds of Known Carcinogenicity, Belonging to the Benz[a]anthracene, Chrysene, and Cyclopenta[a]phenanthrene Series, Using Ames's Test. *Cancer Res.*, **36**, 4525-4529
- (71) Fatima, R. A. and Ahmad, M. (2006) Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: a comparison of three bioassays. *Mutat Res.*, **609**, 81-91

8. Anexos

Anexo A – Listagem de material e equipamento utilizado no decorrer do projeto

Listagem de material utilizado no decorrer do projeto

Fase do Projeto	Material
Colheita/ armazenamento das amostras de água	Jerricans PEAD de 10L
Validação do método SPE-GC-MS e concentração das amostras de água	Balões volumétricos (1mL, 5mL, 1L, 2L)
	Copos
	Provetas
	Pipetas Pasteur
	Pipetas graduadas de escoamento total
	Pipetas volumétricas de escoamento total
	Pompetes
	Micropipetas de 100 e 1000 µL (Eppendorf Research, Saint Louis, EUA)
	Vials de 1,5 mL e tampa de PE com septo de silicone PTFE
	Inserts
	Frascos de vidro em âmbar de 1 e 2,5 L e septo de silicone/PTFE
	Coluna SPE C18 em fase reversa – 500mg/ 6 mL (GracePure, Columbia, EUA)
	Filtros 0,45 µm HA (Millipore, Irlanda)
	Tubos de centrífuga
Aplicação do Teste de Ames	<i>Kitasato</i>
	Barras magnéticas de agitação
	Tubos de ensaio de vidro estéreis com tampa
	Anças
	Placas de pétri estéreis
	Frascos de vidro estéreis
	<i>Eppendorfs</i> estéreis
	Pipetas descartáveis de 25 mL
	Micropipetas de 100 e 1000 µL (Eppendorf Research, Saint Louis, EUA)

Listagem de equipamento utilizado no decorrer do projeto

Fase do Projeto	Equipamento
Colheita/ armazenamento das amostras de água	Arca Frigorífica 4°C (Polipoli, Espinho, Portugal)
Validação do método SPE-GC- MS e concentração das amostras de água	Arca Frigorífica 4°C (Polipoli, Espinho, Portugal)
	Sistema <i>Manifold</i> para SPE com 12 posições (Teknocroma, Barcelona, Espanha)
	Bomba de vácuo (Millipore, Billerica, MA, EUA)
	Equipamento GC-MS Varian 4000 (Varian, Walnut Creek, CA, EUA)
	Purificador de água Sistema Milli-Q Advantage A10 (Millipore, Billerica, MA, EUA) associado a um Elix S (Millipore, Billerica, MA, EUA)
	Máquina de gelo (ITV Ice Makers, local)
	<i>Hotte</i> Vortice (Industrial Laborum, local)
Aplicação do Teste de Ames	Azoto Premier - X50S (Gasin, Matosinhos, Portugal)
	Autoclave
	Agitador magnético (Raypa, Terrassa, Espanha)
	Placa de aquecimento (Raypa, Terrassa, Espanha)
	<i>Vortex</i> (Asal, Cernusco, Itália)
	Balança analítica Mettler-Toledo AE200 (Marshall Scientific, Hampton, NH, EUA)
	<i>Hotte</i> com bico de <i>bunsen</i> (Romero Flowtronic, Cambridge, Inglaterra)
	Câmara de Fluxo Laminar Cytogard (Esi Flufrance, Val de Reuil Cedex, França)
	Arca congeladora -80°C REVCO Ultima II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA)
	Arca frigorífica 4°C (Polipoli, Espinho, Portugal)
	Purificador de água Sistema Milli-Q Advantage A10 (Millipore, Billerica, MA, EUA) associado a um Elix S (Millipore, Billerica, MA, EUA)
	Banho (Kottermann, Hanigsen, Alemanha)
	Estufa Function Line (Heraeus Instruments, Hanau, Alemanha)
	Incubadora de agitação (Gallenkamp, Loughborough, Inglaterra)
	Contador de colónias (Bioblock Scientific, Illkirch Cedex, França)

Anexo B – Resultados da recuperação (%) dos ensaios realizados na validação da metodologia SPE

N.º do Ensaio	Recuperação (%)			
	Terbutilazina	Alacloro	Pireno	Benzo(a)antraceno
1	109,40	82,90	64,90	93,20
2	-	-	52,10	96,00
3	104,40	96,10	70,00	94,80
4	103,00	146,40	62,40	70,50
5	85,00	98,50	75,10	85,80
6	15,40	25,40	61,20	78,40
7	-	-	67,09	72,72
8	-	-	29,70	64,70
9	25,00	27,70	67,40	90,00
10	76,80	85,30	63,30	80,00
11	80,00	95,60	76,90	92,90
12	5,60	19,30	76,70	107,40
13	-	-	55,50	55,30
14	102,20	119,70	92,40	111,00
15	114,40	119,60	64,80	72,30
16	111,60	111,50	65,60	91,30
17	118,40	119,20	78,90	85,90
18	102,50	86,70	63,60	100,50
19	98,90	110,80	68,50	87,30
20	108,70	106,60	73,60	91,90

Anexo C – Resultados do estudo da linearidade do ensaio para obtenção das curvas dose-resposta no Teste de Ames com controlo positivo

Estudo da linearidade da curva dose-resposta da estirpe TA98 sem S9

Resumo do modelo

Modelo	R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro padrão da estimativa
1	,997 ^a	,995	,993	20,153

a. Preditores: (Constante), Concentração de 2NF

ANOVA^a

Modelo		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
1	Regressão	223801,600	1	223801,600	551,054	,000 ^b
	Resíduo	1218,400	3	406,133		
	Total	225020,000	4			

a. Variável Dependente: N.º de colónias

b. Preditores: (Constante), Concentração de 2NF

Coefficientes^a

Modelo		Coefficientes não padronizados		Coefficientes padronizados	t	Sig.
		B	Erro Padrão	Beta		
1	(Constante)	22,800	15,610		1,461	,240
	Concentração de 2NF	149,600	6,373	,997	23,475	,000

a. Variável Dependente: N.º de colónias

Estudo da linearidade da curva dose-resposta da estirpe TA98 com S9

Resumo do modelo

Modelo	R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro padrão da estimativa
1	,972 ^a	,945	,927	14,019

a. Preditores: (Constante), Concentração de DMBA

ANOVA^a

Modelo		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
1	Regressão	10112,400	1	10112,400	51,454	,006 ^b
	Resíduo	589,600	3	196,533		
	Total	10702,000	4			

a. Variável Dependente: N.º de colónias

b. Preditores: (Constante), Concentração de DMBA

Coefficientes^a

Modelo		Coefficientes não padronizados		Coefficientes padronizados	T	Sig.
		B	Erro Padrão	Beta		
1	(Constante)	29,400	10,859		2,707	,073
	Concentração de DMBA	1,272	,177	,972	7,173	,006

a. Variável Dependente: N.º de colónias

Estudo da linearidade da curva dose-resposta da estirpe TA100 sem S9

Resumo do modelo

Modelo	R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro padrão da estimativa
1	,949 ^a	,901	,868	127,989

a. Preditores: (Constante), Concentração de NAN₃

ANOVA^a

Modelo		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
1	Regressão	446787,488	1	446787,488	27,275	,014 ^b
	Resíduo	49143,312	3	16381,104		
	Total	495930,800	4			

a. Variável Dependente: N.º de colónias

b. Preditores: (Constante), Concentração de NAN₃

Coefficientes^a

Modelo		Coefficientes não padronizados		Coefficientes padronizados	T	Sig.
		B	Erro Padrão	Beta		
1	(Constante)	211,976	88,167		2,404	,096
	Concentração de NAN ₃	547,225	104,782	,949	5,223	,014

a. Variável Dependente: N.º de colónias

Estudo da linearidade da curva dose-resposta da estirpe TA100 com S9

Resumo do modelo

Modelo	R	R quadrado	R quadrado ajustado	Erro padrão da estimativa
1	,756 ^a	,571	,428	363,136

a. Preditores: (Constante), Concentração de NAN₃

ANOVA^a

Modelo		Soma dos Quadrados	df	Quadrado Médio	Z	Sig.
1	Regressão	526702,500	1	526702,500	3,994	,140 ^b
	Resíduo	395603,500	3	131867,833		
	Total	922306,000	4			

a. Variável Dependente: N.º de colónias

b. Preditores: (Constante), Concentração de NAN₃

Coefficientes^a

Modelo		Coefficientes não padronizados		Coefficientes padronizados	t	Sig.
		B	Erro Padrão	Beta		
1	(Constante)	543,000	281,284		1,930	,149
	Concentração de NAN ₃	9,180	4,593	,756	1,999	,140

a. Variável Dependente: N.º de colónias